

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIANE DE OLIVEIRA BORGES

ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNAS DA LARVA E DAS GLÂNDULAS
ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE *Heliconius erato phyllis* Fabricius,
1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE): ADAPTAÇÕES
EVOLUTIVAS COM BASE NA ECOLOGIA QUÍMICA.

CURITIBA

2012

ELIANE DE OLIVEIRA BORGES

ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNAS DA LARVA E DAS GLÂNDULAS
ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE *Heliconius erato phyllis* Fabricius,
1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE): ADAPTAÇÕES
EVOLUTIVAS COM BASE NA ECOLOGIA QUÍMICA.

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, do departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin

CURITIBA

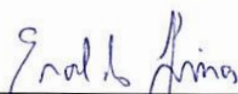
ELIANE DE OLIVEIRA BORGES

“ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNAS DA LARVA E DAS
GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE *Heliconius
erato phyllis* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae):
ADAPTAÇÕES EVOLUTIVAS COM BASE NA ECOLOGIA QUÍMICA”

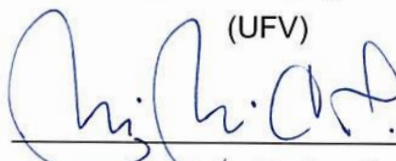
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre
em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Eraldo Rodrigues de Lima
(UFV)



Profa. Dra. Mirna Martins Casagrande
(UFPR)

Curitiba, 05 de julho de 2012.

Dedico este trabalho ao meu companheiro, amigo e esposo, José Attila Vernet Taborda, por toda a sua compreensão e carinho, e aos meus pais (*in memoriam*), Sueli de Oliveira Borges e Celso Siqueira Borges.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarkin, pela orientação, pelas oportunidades vivenciadas e conhecimento adquirido.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, aos funcionários da UFPR, e ao pessoal de segurança na pessoa de Luís (Águia I), que me colocou em contato com as borboletas do Campus do Centro Politécnico.

À responsável de divisão do Museu Botânico Municipal (MBM) Clarisse Bolfe Poliquesi e ao curador do MBM, Osmar dos Santos Ribas do Jardim Botânico de Curitiba, pelo fornecimento de mudas de plantas utilizadas neste trabalho de pesquisa.

Ao professor Gedir de Oliveira Santos pela liberação do espaço para construção do insetário.

Ao professor Bruno Grimaldo Martinho Churata do Laboratório de Estatística Aplicada da UFPR, pela orientação na análise dos resultados estatísticos.

À Reserva Ambiental Serelepe pelo fornecimento de adultos de *H. erato phyllis* para a criação, utilizados no capítulo I deste trabalho, em especial à Mariana pela grande ajuda.

Aos colegas biólogos e agrônomos do PPG Entomologia, pelas trocas valiosas e amizade. Em especial à Dayana, Anderson, Marcelo, Mariana, Juliana, Manoela, Fábio, Maurício, Tatiana, Elisiane e Estela.

Aos colegas químicos, biólogos e agrônomos, do Laboratório de Semioquímicos pela ajuda nos procedimentos com equipamentos, análises, e amizade: Miryan, Diogo, Emir, Camila, Carla, Rafael, Ângela e Douglas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE QUADROS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
APRESENTAÇÃO.....	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO GERAL.....	20
 CAPÍTULO I. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNALIS DA LARVA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE)	26
1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Adaptação defensiva	28
1.1.2 Glândulas exócrinas da larva.....	29
1.1.2.1 A glândula adenosma ou jugular.....	30
1.1.2.1.1 Função e composição química da secreção	31
1.1.2.1.2 A glândula adenosma ou jugular – Nymphalidae	31
1.1.2.2 As glândulas prosternais.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 O objetivo geral	35
2.2 Os objetivos específicos	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Criação e manejo de adultos e larvas de <i>H. erato phyllis</i>	38
3.2 Manejo dos adultos operários de <i>Tapinoma melanocephalum</i> (Hymenoptera: Formicidae)	41
3.3 Procedimentos analíticos e análises químicas	42
3.3.1 Extração por solvente	42

3.3.1.1 Dissecção	42
3.3.2 Aeração	43
3.3.3 Métodos de análises dos extratos	44
3.3.3.1 Cromatografia gasosa (CG)	44
3.3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	44
3.4 Bioensaios – Experimentos comportamentais	45
3.4.1 Glândulas pareadas	45
3.4.1.1 Ataques naturais e simulados	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Criação e manejo de adultos e larvas de <i>H. erato phyllis</i>	47
4.1.1 Insetário, sala de criação	47
4.1.2 Relações interespecíficas	48
4.2 Análises químicas	50
4.2.1 Extração por solvente	50
4.2.2 Aerações	51
4.3 Bioensaios – Experimentos comportamentais	52
4.3.1 Glândulas Pareadas	52
4.3.1.1 Ataques naturais e simulados	52
5 DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	58

CAPÍTULO II. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE).	68
1 INTRODUÇÃO	70
1.1 Adaptação defensiva – Adulto	70
1.2 Sucesso adaptativo	71
1.3 Antiafrodisíacos	71
1.4 O abdome dos adultos	72
1.4.1 Produção e recepção de antiafrodisíaco – Heliconiinae	74
1.4.2 Composição química do antiafrodisíaco	75
1.4.3 O antiafrodisíaco – Função	76
1.5 A evolução do antiafrodisíaco conduzida pela seleção sexual	77
1.6 As glândulas Odoríficas abdominais e o comportamento de corte	78

2 OBJETIVOS.....	80
2.1 O objetivo geral	80
2.2 Os objetivos específicos	80
3 METODOLOGIA	81
3.1 Criação – manejo de adultos	83
3.2 Procedimentos analíticos e análises Químicas	85
3.2.1 Extração por solvente	85
3.2.1.1 Dissecação	85
3.2.2 Métodos de análises dos extratos.....	86
3.2.2.1 Cromatografia gasosa (CG)	86
3.2.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	87
3.3 Atividade biológica intraespecífica	88
3.3.1 Bioensaios	88
3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à detector de eletroantenograma (CG-EAD).....	89
3.4 Localização e morfologia externa	90
4 RESULTADOS	93
4.1 Criação – manejo de adultos	93
4.2 Extração por solvente	94
4.2.1 Dissecação	94
4.2.2 Análises químicas	95
4.3 Atividade biológica intraespecífica	106
4.3.1 Bioensaios	106
4.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à detector eletroantegráfico (CG-EAD)	107
4.4 Caracterização - Localização e morfologia externa das Glândulas Odoríficas Abdominais.....	108
4.4.1 Localização.....	108
4.4.1.1 Fêmea – Abdome	108
4.4.1.2 Macho – Genitália	109
4.4.2 Morfologia externa	110
4.4.2.1 Fêmea	110
4.4.2.2 Macho.....	113
5 DISCUSSÃO.....	114

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	124
Proposta de estudo sobre a existência das glândulas prosternais, função da glândula prosternal impar da larva e relações interespecíficas envolvendo feromônios emitidos pelas glândulas odoríferas abdominais do adulto, em Nymphalidae.....	124
APÊNDICE A – Tabelas complementares.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Resumo esquemático da metodologia de análise das glândulas prosternais pareadas e impar da larva de <i>H. erato phyllis</i> .	37
FIGURA 2. A, vista do insetário ao fundo. B, oviposição da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> .	38
FIGURA 3. A, passifloráceas no interior do insetário. B, flores de plantas psicófilas (<i>L. camara</i> e <i>I. walleriana</i>) utilizadas como fonte de alimentação natural dos adultos de <i>H. erato phyllis</i> .	39
FIGURA 4. Adulto de <i>H. erato phyllis</i> identificado com caneta atóxica na asa direita.	39
FIGURA 5. A, mudas de <i>P. edulis</i> . B, frascos com folhas e larvas.	40
FIGURA 6. A, alimentação artificial de adultos de <i>H. erato phyllis</i> . B, coleta de ovos.	40
FIGURA 7. A, frascos para manutenção de larvas de <i>H. erato phyllis</i> . B, sala de criação.	41
FIGURA 8. A, armadilha para captura de formigas <i>T. melanocephalum</i> . B, recipiente plástico para manutenção de formigas <i>T. melanocephalum</i> .	42
FIGURA 9. A, vista interna da região prosternal, (GI) glândula impar e (GPs) glândulas pareadas. Aum.= 50x. Barra= 1 mm. B, frasco para preparação de extrato.	43
FIGURA 10. A, sistema de aeração de planta (muda de <i>P. edulis</i>) e larva de <i>H. erato phyllis</i> . B, preparação do extrato. C, sistema de aeração de larvas de <i>H. erato phyllis</i> .	44
FIGURA 11. A, CG. B, CG-EM.	45
FIGURA 12. A, vista dorsal do macho de <i>H. erato phyllis</i> , onde se observa as características morfológicas que identificam a espécie. B, vista ventral.	47
FIGURA 13. <i>T. melanocephalum</i> . Aum.= 50x. Barra= 1mm.	49
FIGURA 14. <i>Araneus sp.</i> . Aum.= 10x. Barra= 1mm.	49
FIGURA 15. Cromatograma do extrato da glândula prosternal impar. 01-02=ácidos graxos, 03-08=hidrocarbonetos de cadeias variadas.	50
FIGURA 16. Cromatograma do extrato das glândulas prosternais pareadas. 01-02=ácidos graxos, 03-08=hidrocarbonetos de cadeias variadas.	51
FIGURA 17. Cromatograma do extrato de planta com larva de quinto instar, resultante de aeração. Todos os picos correspondem a voláteis da planta.	51
FIGURA 18. Larva de quinto instar de <i>Heliconius erato phyllis</i> detecta o predador (fios de um pincel), dirigindo lhe jatos da secreção das glândulas pareadas.	53

FIGURA 19. Larva de quinto instar de <i>Heliconius erato phyllis</i> durante o ataque artificial.....	54
FIGURA 20. Larva de quinto instar de <i>Heliconius erato phyllis</i> durante ataque artificial, a larva regurgita e morde o objeto que a incomoda (fios de um pincel).	55
FIGURA 21. Resumo esquemático da metodologia de análise das glândulas odoríficas abdominais dos adultos de <i>H. erato phyllis</i>	82
FIGURA 22. Área de reprodução construída no interior do insetário.....	83
FIGURA 23. A, alimentação artificial de adultos na sala de criação. B, adultos de <i>H. erato phyllis</i> mantidos na sala de criação.	84
FIGURA 24. Cópula de adultos de <i>H. erato phyllis</i> na área de reprodução do insetário.	85
FIGURA 25. A, CG acoplado a detector eletroantegráfico (CG-EAD). B, antena de adulto de <i>H. erato phyllis</i> fixada com gel condutor a dois eletrodos de aço inox do sistema de cromatografia gasosa acoplada à detector eletroantegráfico (CG-EAD).	90
FIGURA 26. A, estereomicroscópio Zeiss® STEMI SV6 acoplado à câmara clara. B, análise em estereomicroscópio.	91
FIGURA 27. A, microscópio eletrônico de varredura Jeol® JSM 6360LV. B, aparelho CPD 030 Baltec.....	92
FIGURA 28. A, metalizadores. B, peças metalizadas.....	92
FIGURA 29. Vista posterior do abdome do macho; (asteriscos), glândulas odoríficas abdominais. Aum.= 40x. Barra= 1 mm.	95
FIGURA 30. A, vista posterior e dorsal do abdome da fêmea; (asterisco), glândula odorífica abdominal extrudada de <i>H. erato phyllis</i> ; (setas), bastões odoríficos. Aum.= 25x. B, (setas), detalhe dos bastões odoríficos. Aum.= 40x. Barras= 1 mm.....	95
FIGURA 31. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea virgem (concentração de 1 a 50µL/glândula); (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	96
FIGURA 32. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea acasalada; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	96
FIGURA 33. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal do macho maduro; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	97
FIGURA 34. Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal do macho com 1, 2 e 3 dias; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	97
FIGURA 35. Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal da (Fv), fêmea virgem; (Fa), fêmea acasalada; e (Ma)	

	macho acasalado, logo após o acasalamento; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).....	102
FIGURA 36.	Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal; (Ma), macho acasalado; (Fa), fêmea acasalada, logo após o acasalamento; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).....	103
FIGURA 37.	Imagem de fêmea virgem sendo exposta aos voláteis da glândula odorífica abdominal de macho maduro de <i>H. erato phyllis</i> ; (asterisco), papel filtro com o extrato.	106
FIGURA 38.	Detalhe de eletroantenograma de resposta da antena do macho maduro para o extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea virgem; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	107
FIGURA 39.	Detalhe de eletroantenograma de resposta da antena da fêmea virgem para o extrato da glândula odorífica abdominal do macho maduro; (5), composto com atividade biológica (IR= + 23,02 min); (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5µL/extrato).	108
FIGURA 40.	Abdome da fêmea em vista lateral; (I-VIII), segmentos.....	109
FIGURA 41.	A, ilustração esquemática da genitália do macho. B, valva, face interna e externa.	110
FIGURA 42.	A, bastão odorífico da glândula odorífica abdominal da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> (seta), lobo do saco glandular mostrando as projeções translúcidas (asterisco). Aum.= 25x. B, lobos recolhidos, vista interna. Aum.= 32x. C, lobo do saco glandular mostrando conexão com bastão odorífico. Aum.= 40x. Barras= 1 mm.	111
FIGURA 43.	A, detalhe das projeções translúcidas. B, os dois lobos do saco glandular separados na sua superfície por área esclerotizada (asterisco).	112
FIGURA 44.	A, glândula odorífica abdominal em vista lateral, bastão odorífico (seta). B, detalhe do bastão odorífico.	112
FIGURA 45.	A, valva do macho de <i>H. erato phyllis</i> mostrando as cerdas translúcidas (seta), Aum.= 40x, Barra= 1 mm. B, detalhe da extremidade afilada e queratinizada da face interna da valva com dentículos.	113

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. ATIVIDADE BIOLÓGICA INTRAESPECÍFICA DO EXTRATO DA GLÂNDULA ODORÍFICA ABDOMINAL DO MACHO OBSERVADA EM FÊMEAS VIRGENS DE <i>Heliconius erato phyllis</i>	107
TABELA 2. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS NA FÊMEA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> PARA O EXTRATO DA GLÂNDULA ODORÍFICA ABDOMINAL DO MACHO.....	126
TABELA 3. QUANTIDADE MÉDIA DOS COMPOSTOS POSSIVELMENTE BIOATIVOS DOS EXTRATOS DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO MACHO DE <i>Heliconius erato phyllis</i> EM UM, DOIS E TRÊS DIAS.	126
TABELA 4. QUANTIDADE MÉDIA DOS COMPOSTOS POSSIVELMENTE BIOATIVOS DOS EXTRATOS DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO MACHO e da FÊMEA DE <i>Heliconius erato phyllis</i> LOGO APÓS O ACASALAMENTO.	127

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1. COMPORTAMENTOS PADRONIZADOS PARA IDENTIFICAR A BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS PARA MACHOS de <i>H. erato phyllis</i>	88
--	----

QUADRO 2. COMPORTAMENTOS PADRONIZADOS PARA IDENTIFICAR A BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS PARA FÊMEAS de <i>H. erato phyllis</i>	89
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Dados quantitativos de ovos coletados, adultos emergidos liberados e da média de adultos no insetário durante o período de criação (2011).	48
GRÁFICO 2. Dados quantitativos de ovos coletados, adultos emergidos e da média de adultos no insetário durante o período de criação (2012).	94
GRÁFICO 3. Variação do composto (1) um das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de <i>H. erato phyllis</i> em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 107.0$, $GL = 2$	98
GRÁFICO 4. Variação do composto (2) dois das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de <i>H. erato phyllis</i> em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 34.8$, $GL = 2$	99
GRÁFICO 5. Variação do composto (3) três das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de <i>H. erato phyllis</i> em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 38,4$, $GL = 2$	100
GRÁFICO 6. Variação do composto (4) quatro das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de <i>H. erato phyllis</i> em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 13,2$, $GL = 2$	101
GRÁFICO 7. Variação do composto (5) cinco das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de <i>H. erato phyllis</i> em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 7,9$, $GL = 2$	102
GRÁFICO 8. Quantidade média do composto um das glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> , logo após o acasalamento.....	103
GRÁFICO 9. Quantidade média do composto dois das glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> , logo após o acasalamento.....	104

GRÁFICO 10. Quantidade média do composto três das glândulas odoríferas abdominais do macho e da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> , logo após o acasalamento.....	104
GRÁFICO 11. Quantidade média do composto quatro das glândulas odoríferas abdominais do macho e da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> , logo após o acasalamento.....	105
GRÁFICO 12. Quantidade média do composto cinco das glândulas odoríferas abdominais do macho e da fêmea de <i>H. erato phyllis</i> , logo após o acasalamento.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
CG	Cromatografia gasosa ou cromatógrafo gasoso
CG-EAD	Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
EAD	Detector eletroantenográfico (do inglês, electroantennographic detector)
EM	Espectrometria de massas
F	Estat. F (Programa estatístico R)
FID	Detector de ionização de chama (do inglês, flame ionization detector)
GI	Glândula Impar
GL	Graus de liberdade
GPs	Glândulas pareadas
IR	Índice de retenção (tempo de retenção do composto)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Microscopia óptica
NG	Nanogramas
T1	Protórax
TIFF	Formato de imagem etiquetada (do inglês, Tagged Image File Format)

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado está dividida em dois capítulos:

CAPÍTULO I. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNAS DA LARVA DE *Heliconius erato phylis* Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONINAE).

CAPÍTULO II. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE *Heliconius erato phylis* Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE).

ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNAS DA LARVA E DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO ADULTO DE *Heliconius erato phyllis* Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE): ADAPTAÇÕES EVOLUTIVAS COM BASE NA ECOLOGIA QUÍMICA.

RESUMO

Esta pesquisa tem como objetivo geral analisar as glândulas prosternais da larva e as glândulas odoríferas abdominais do adulto de *Heliconius erato phyllis* com base na ecologia química. As glândulas prosternais da larva, sugeridas como glândulas de defesa, são internas e associadas a um saco cônico tegumentar, que aparece em glândulas de larvas de outros lepidópteros, para estas foi adotada a denominação de glândula adenosma ou jugular. As glândulas prosternais são formadas por dois tipos glandulares, a glândula ímpar, formada por uma unidade glandular e as glândulas pareadas, formadas por duas unidades glandulares. As glândulas odoríferas abdominais dos adultos de *H. erato phyllis* estão associadas originalmente à função de defesa e à produção e transferência de antiafrodisíaco. Estão localizadas nas valvas do macho que transfere seu “*bouquet*” odorífero durante a cópula, para a glândula abdominal dorsal amarela ou alaranjada presente na fêmea. Como metodologia de procedimentos analíticos, adotou-se a extração por solvente e a aeração para extração de possíveis voláteis, e como metodologia de análises químicas adotou-se a cromatografia gasosa e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A metodologia de análise da bioatividade dos compostos deu-se através de bioensaios comportamentais e eletroantenografia. Os resultados dessa investigação, associados à teoria pertinente, possibilitaram o diagnóstico acerca da possível composição química da secreção das glândulas prosternais e função das glândulas prosternais pareadas da larva, e da possível composição química da secreção e função das glândulas odoríferas abdominais do adulto. Entre outros aspectos, as possíveis funções das glândulas aqui evidenciadas representam para os possuidores de tais fenótipos, dispersos entre diferentes espécies, possíveis adaptações evolutivas, que podem contribuir para um maior sucesso adaptativo, observado em lepidópteros neotropicais do gênero *Heliconius* Kluk, 1780.

Palavras-chave: Antiafrodisíaco. Borboletas. Defesa larval. Feromônio.

ANALYSIS OF THE PROSTERNAL GLANDS OF THE LARVA AND OF THE ABDOMINAL SCENT GLANDS OF ADULT OF *Heliconius erato phyllis* Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE): EVOLUTIONARY ADAPTATIONS BASED ON CHEMICAL ECOLOGY.

ABSTRACT

The main objective of this research was to analyze the prosternal glands of the larva and the abdominal scent glands of the adult of *Heliconius erato phyllis* based on the chemical ecology. The prosternal glands of the larva, suggested as defense glands, are internal and associated with a conic integumentary sac, that appears in the glands of larvae of other Lepidoptera, was adopted for these the name of adenosma or jugular gland. The prosternal glands are formed by two types glandular, the impair gland, formed by a glandular unit, and the paired glands, formed by two glandular units. The Heliconiinae scent abdominal glands of the adult are originally associated to the function of defense and production and transfer of antiaphrodisiac. The antiaphrodisiac is produced by glands located in the valves of the male and transferred during copulation, to the yellow or orange dorsal abdominal gland present in the female. As methodology of analytical procedures were adopted the extraction with solvent and aeration for to extract volatile possible and, as chemical analysis method were adopted the gas chromatography and the gas chromatography associated to mass spectrometry. The methodology of analyze of the bioactivity of the compounds was made through behavioral bioassays and electroantennograms. The results of this research, linked to relevant theory, allowed the diagnosis about the possible chemical composition of the secretion and function of the prosternal paired glands of the larva and possible chemical composition of the secretion and function of abdominal scent glands of adult. Among other things, the possible functions of the glands demonstrated here represent for the owners of such phenotypes, scattered among different species, possible evolutionary adaptations that can promote a greater adaptive success, observed in Neotropical Lepidoptera of the genus *Heliconius* Kluk, 1780.

Keywords: Antiaphrodisiac. Butterflies. Defense larval. Pheromone.

INTRODUÇÃO GERAL

A ecologia química estuda o comportamento e as relações entre os seres vivos a partir de interações químicas. As substâncias químicas empregadas na comunicação entre espécies diferentes (interespecíficas) são denominadas de aleloquímicos e são divididos em alomônios (favorecem a espécie emissora), cairomônios (favorecem a espécie receptora) e sinomônios (ambas são favorecidas). Os alomônios geralmente são compostos utilizados para a defesa da espécie, enquanto os cairomônios são as substâncias produzidas por uma presa e que são percebidas pelo predador. As substâncias excretadas por organismos vivos e detectadas por outros indivíduos da mesma espécie, produzindo mudanças de comportamento específicas são conhecidas como feromônios (*pherein*=transferência + *hormon*=excitar). Estes atuam na comunicação intraespecífica (entre membros de uma mesma espécie), são exemplos os feromônios sexuais (provocam a atração entre macho e fêmea), os feromônios de alarme, produzem estado de alerta pela aproximação de algum predador natural e os feromônios de trilha e oviposição demarcam, respectivamente, o caminho até uma fonte de alimento e o local onde os ovos foram depositados. Estas substâncias químicas utilizadas para a comunicação (alomônios, cairomônios, feromônios, etc.) são denominadas genericamente por semioquímicos (*semion* = marca ou sinal) (FERREIRA & ZARBIN 1998). A coleta dos semioquímicos se dá através de, basicamente, dois métodos: a aeração que consiste da coleta de voláteis, e a extração por solvente feita diretamente da glândula. As análises são realizadas através de técnicas físico-químicas principalmente da espectrometria de massas e da cromatografia gasosa, os compostos biologicamente ativos são determinados através da cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico. Os testes comportamentais, ou bioensaios identificam qual o tipo de resposta do inseto diante do semioquímico sintético, assim elucidando qual a função do composto no processo de comunicação dos insetos (ZARBIN *et al.* 1998).

Lepidópteros do gênero *Heliconius* Kluk, 1780 formam um dos grupos mais bem sucedido de borboletas neotropicais; apresentam várias adaptações evolutivas

como o mimetismo Mülleriano (TURNER 1981), a impalatabilidade, a especificidade de planta hospedeira, eventos vantajosos de acasalamento, como a ocorrência de cópula logo após a emergência da fêmea (TURNER 1981, GILBERT 1976, DEINERT 2003, KLEIN & ARAUJO 2010), o fornecimento de presente nupcial como espermatóforos maiores e mais nutritivos que podem proteger quimicamente os ovos e fêmeas (CARDOSO *et al.* 2009), dentre outras. O conhecimento da morfologia interna e externa de suas larvas e adultos, embora incipiente, adiciona possíveis novos caracteres, antes não conhecidos, a este conjunto de adaptações. Dentre estes caracteres encontram-se alguns relacionados com glândulas exócrinas cuja morfologia e fisiologia são desconhecidas.

Os heliconíneos são conhecidos biologicamente, por sua estreita associação com plantas da família Passifloraceae na região Neotropical. As passifloráceas fornecem local para oviposição, fonte de alimentação para larvas, e para a aquisição de composição química diferenciada (revistas por BENSON *et al.* 1976, BROWN 1981, GILBERT 1991). A oviposição ocorre na região apical (meristema, primórdios foliares e primeira folha fechada) dos ramos. Esta oviposição exclusiva sugere uma coevolução entre as plantas hospedeiras e os heliconíneos (BENSON *et al.* 1976). Amplamente distribuídas pelo Brasil as espécies de passifloráceas variam de acordo com a região, sub-região e província biogeográfica (MOREIRA *et al.* 2011). Na região de Curitiba, especificamente nas áreas remanescentes da Mata Atlântica, dentre outras espécies, são observadas *Passiflora actinia* Hooker, 1943 e *Passiflora edulis* Sims, 1818.

Heliconius erato phylis Fabricius, 1775, (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae) é uma das 29 subespécies de *Heliconius erato* Linnaeus, 1758, espécie mais variável do gênero *Heliconius*. Os adultos da subespécie possuem amplo espectro visual e cérebro avantajado (SWIHART & SWIHART 1970), um comportamento apurado, como a capacidade de aprendizado e noção de localização espacial relacionada com a habilidade na escolha de sítios de oviposição e alimentação (GILBERT 1975), possuem uma alimentação, em populações naturais, formada por néctar e pólen (GILBERT 1972), sendo que esta dieta tem influência na longevidade, fecundidade e na fertilidade dos ovos (DUNLAP-PIANKA *et al.* 1977), entre outras características. A subespécie apresenta ampla distribuição na América do Sul, com ocorrências desde o nordeste até o sul do Brasil, Bolívia, nordeste da

Argentina, Uruguai (KAMINSKI *et al.* 2002), e Paraguai (HOLZINGER & HOLZINGER 1994). Está presente em matas perturbadas ou abertas, e em clareiras em matas densas (BROWN 1992), locais onde existam passifloráceas e espécies plantas com flores psicófilas (CORRÊA *et al.* 2001), para o fornecimento de néctar e pólen.

Os adultos, pupas, e larvas de *H. erato phyllis*, possuem glicosídeos cianogênicos em seus tecidos, que os tornam impalatáveis a vertebrados predadores. Fato que lhes determina um alto grau de toxicidade, funcionando como um mecanismo antipredador. O adulto produz tais substâncias a partir de aminoácidos (aa) precursores (NAHRSTEDT & DAVIS 1983, SPENCER 1988), e estes aa podem ser oriundos do pólen ingerido pelos adultos (GILBERT 1991); ou ainda, sequestrados ou modificados a partir das plantas hospedeiras, ou, alternativamente, sintetizados pelas larvas (BORGES *et al.* 2010).

Através de parâmetros morfométricos como a largura da cápsula cefálica e morfológicos como padrão de coloração e distribuição e forma das cerdas, são identificados cinco instares larvais na subespécie (KAMINSKI *et al.* 2002). São cinco as ecdises da larva, sendo que em cada uma delas a larva fica praticamente imóvel e não se alimenta. A muda ocorre no início da tarde e pode ser identificado pelo tórax arqueado dorsalmente e a cabeça voltada para baixo. A cutícula dorsal entre o protórax e a cápsula cefálica torna-se enormemente distendida e surge uma banda pálida por baixo dessa região. Na manhã seguinte, a cabeça é curvada gradualmente para trás e a cutícula entre a cápsula cefálica antiga e a região ventral do primeiro segmento torácico se fende. A cápsula cefálica antiga se desprende gradualmente e o corpo emerge através da fenda por pressão hidrostática interna. Em contato com o ar a nova cutícula se expande e juntamente com a cápsula cefálica se enrijece. Após algumas horas a larva retoma a alimentação. As pupas medem em média 33,5 mm de comprimento do qual emerge o adulto dentro de 7 a 11 dias, após o empupamento (FERRO 1998). Em larvas de *H. erato phyllis*, observa-se a ocorrência de canibalismo, e em trabalho recente de De Nardin e Araújo (2011), a não predação de ovos por larvas aparentadas. O conhecimento da existência deste comportamento entre as larvas de *H. erato phyllis* determina que, quando criadas em insetário, devam ser separadas assim que eclodem, nas primeiras horas da manhã e, criadas em separado (FERRO 1998). O

comportamento territorial da larva de *H. erato phyllis* pode estar relacionado com a competição, definida como a disputa entre dois ou mais indivíduos, ou grupo de indivíduos, por um recurso limitante, sendo o mais importante a disponibilidade de alimento (LOPES & DE MARCO 2000).

O adulto de *H. erato phyllis* apresenta nas asas anteriores, a cor preta de fundo, com uma faixa vermelha, mais espessa na borda distal como uma figura em forma de dente longo na direção da margem externa, asas posteriores com área amarela transversal, abaixo da qual se encontram pontos vermelhos e manchas amarelas marginais (HOLZINGER & HOLZINGER 1994); os pontos vermelhos com variação sazonal desde um até sete, considerados como polifenismo numérico em estudo realizado em diferentes regiões do estado de São Paulo (RAMOS & FREITAS 1999).

São conhecidas 56 espécies de angiospermas cujas flores são utilizadas como fonte de alimentação, por pólen e néctar, dos adultos de *H. erato phyllis* no Brasil. Dentre estas plantas, em estudo de Corrêa et al. (2001), em 23 espécies identificadas do Rio Grande do Sul, há predominância de ervas, com distribuição de flores com inflorescências, com ampla variação com relação às cores e formas, prevalecendo as tubiformes, como o tipo floral de *Lantana camara* Linnaeus, 1753; tipo calcaradas, como em *Impatiens walleriana* Hook, ou ainda providas de câmara para acúmulo de néctar, como em *Asclepias curassavica* Linnaeus. E, mesmo com a grande plasticidade ecológica quanto à variação dos recursos alimentares utilizados pelos adultos de *H. erato phyllis*, estes respondem rapidamente tanto em escala temporal quanto espacial (CORRÊA et al. 2001, RAMOS & FREITAS 1999, ROMANOWSKI et al. 1985).

Larvas, pupas e adultos de lepidópteros são predados por diferentes taxa animais. Dentre os predadores mais importantes encontram-se as aves, morcegos, e provavelmente outros pequenos mamíferos; também são predadores: vários répteis, formigas (Hymenoptera: Formicidae), aracnídeos, a espécie humana (SCOBLE 1995), entre outros. Cita Kaminski et al. (2009) que de 59 estudos compilados por Rico-Gray e Oliveira (2007) abordando o efeito de formigas sobre plantas com nectários extraflorais, 25 envolvem efeitos negativos das formigas sobre lepidópteros, que podem ser amplificados pelo efeito de interações indiretas com

outros herbívoros (FUKUI 2001, OLIVEIRA & DEL-CLARO 2005, ANDO & OHGUSHI 2008). Juntamente com os pássaros, as formigas são consideradas os principais predadores de larvas de lepidópteros (SCOBLE 1995, SALAZAR & WHITMAN 2001). É durante o estabelecimento da larva sobre a planta hospedeira que se dá o efeito predatório das formigas, e que ocorre exclusivamente nos imaturos (SMILEY 1985, MEGA & ARAÚJO 2008). Sendo um dos maiores problemas para a sobrevivência das larvas de lepidópteros, é uma das principais causas de mortalidade (SALAZAR & WHITMAN 2001, GENTRY & 2002), que foi indicado através de estudos experimentais envolvendo a exclusão de formigas; onde houve uma maior mortalidade larval em plantas visitadas por formigas do que em plantas sem formigas (SATO & HIGASHI 1987, FREITAS & OLIVEIRA 1996, DUTRA *et al.* 2006). As formigas são abundantes sobre a vegetação, onde atuam como herbívoros e competem pelas fontes de alimentos renováveis que podem potencializar a sua visita (revisado por RICO-GRAY & OLIVEIRA 2007). Apesar dos recursos fornecidos pelas plantas constituírem o principal item alimentar de muitas formigas arborícolas, muitas espécies podem também se comportar como predadoras oportunistas (FLOREN & LINSENMAIR 2002, DAVIDSON *et al.* 2003), ou mesmo com alto grau de especialização (MORAIS 1994). Considerando essa dominância sobre a folhagem, é razoável pensar que as formigas devam exercer um forte impacto sobre a biologia de insetos herbívoros.

As passifloráceas possuem nectários extraflorais, nos pecíolos, margens e superfícies, brácteas e estípulas das folhas e a sua presença sugere interações ecológicas entre animais e plantas; e várias espécies de formigas estão associadas às passifloráceas (DEL VAL & DIRZO 2004). Sendo estas plantas hospedeiras para as larvas de *H. erato phyllis*, estas formigas predam seus ovos e larvas (GILBERT 1975, SMILEY 1985, 1986).

Diferentes espécies de formigas como *Ectatomma ruidum* Roger, 1860, *E. tuberculatum* Olivier, 1791, e gêneros como *Crematogaster* Lund, 1831, *Pheidole* Westwood, 1841, *Solenopsis* Westwood, 1840, *Pseudomyrmex* Lund, 1831, *Brachymyrmex* Mayr, 1868, *Camponotus* Mayr, 1861, *Paratrechina* Latreille, 1802 e *Tapinoma* Förster, 1850, são encontradas nos ramos de passifloráceas (DEL VAL & DIRZO 2004). As características ecológicas e hábitos comportamentais da espécie *Tapinoma melanocephalum* Fabricius, 1793, fizeram desta espécie de formiga um

modelo ideal para estudar comportamento defensivo e adaptações em larvas de *H. erato phyllis*. Esta espécie é uma praga comum em edificações urbanas, tais como residências, hospitais e laboratórios (FOWLER *et al.* 1993, DE ZARZUELA *et al.* 2007), em que podem, potencialmente, atuar como vetores de microrganismos ou mesmo como predadores em laboratórios de criação de insetos (TAMSITT & FOX 1966, MOREIRA *et al.* 2005). Popularmente conhecida como "*ghost-ant*", *T. melanocephalum* é altamente adaptada para um grande número de habitats devido à sua alta tolerância a variações de temperatura e umidade (APPEL *et al.* 2004) e é conhecida por ser uma das espécies mais difundidas de formigas do mundo (WETTERER 2009). Apresenta hábito alimentar muito generalista, que varia de fontes de alimentos açucarados a espécies mortas ou vivas de artrópodes (OSBORNE *et al.* 1995, SCHEURER & LIEBIG 1998).

CAPÍTULO I. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS PROSTERNALIS DA LARVA DE
Heliconius erato phylis Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE:
HELICONIINAE)



RESUMO

Capítulo I. As glândulas prosternais foram primeiramente descritas em larvas de *Heliconius erato phyllis* e, são formadas por dois tipos glandulares, a glândula impar, formada por uma unidade glandular e as glândulas pareadas, formadas por duas unidades glandulares. O objetivo geral deste estudo foi analisar a existência de eventuais secreções nas glândulas prosternais e verificar o modo de ação destas secreções. A metodologia de análises químicas abrangeu a extração por solvente e aeração e, análise em cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os resultados obtidos revelaram que não produzem voláteis, mas um conjunto de compostos complexos que possivelmente podem resultar em óleo, açúcares, e fibras. Foram realizados bioensaios com ataques simulados e naturais. Os bioensaios revelaram que as glândulas pareadas produzem secreção de defesa utilizada juntamente com a seda produzida pelas glândulas labiais em estratégia de defesa descrita pela primeira vez, contra formigas. A estratégia consiste em enrolar a formiga com fios de seda, conduzir o conjunto para a porção final do corpo, com o auxílio das pernas e larvópodos e possivelmente fixa-lo em lugar próximo.

ABSTRACT

Chapter I. The prosternal glands were first described for *Heliconius erato phyllis* larvae and, are formed by two types glandular, the impair gland, formed by a glandular unit, and the paired glands, formed by two glandular units. The main goal of this study was to analyze the existence of any secretions from the prosternal glands, and check the action mode of these secretions. The methodology used for chemical analysis of the prosternal glands included the solvent extraction and aeration and, analysis in gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. The results show that the prosternal glands do not produce volatiles, but a complex group of compounds that could possibly result in oils, sugars, and fibers. Experiments were conducted with simulated attacks and natural. Bioassays revealed that the paired glands produce secretion of defense together with silk produced by labials glands as a defense strategy described for the first time, against ants. The strategy consists in wrapping the ant with silk thread, the entire whole moved to the end of the body, with the aid of the legs and prolegs and possibly fixing it in next place.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adaptação defensiva

O comportamento de defesa corresponde a uma adaptação evolutiva, esta é definida como um processo, que envolve uma mudança genética, criação de um novo caráter fenotípico, e uma maior aptidão genética do indivíduo que possui este caráter (BARROWS 2000). Lepidópteros apresentam mimetismo, camuflagem, aposematismo, o disfarce em objetos não comestíveis (SCOBLE 1995), entre outros.

Segundo Kaminski *et al.* (2009), devido ao fato de se alimentarem de espécies de plantas visitadas por formigas, as larvas de lepidópteros desenvolveram uma série de defesas. Estas possíveis estratégias das larvas contra predadores foram foco de uma revisão feita por Salazar e Whitman (2001), onde as referidas defesas podem ser divididas em duas classes: defesas primárias que previnem o encontro entre predador e larva, e defesas secundárias que previnem o ataque após a detecção de um predador potencial pela larva (GROSS 1993). São exemplos de defesas primárias: a construção de abrigos e de pontes, que servem de barreira mecânica e que diminuem a probabilidade de encontro da larva com a formiga, respectivamente; cita-se ainda o mimetismo Müllleriano (WILLMOTT *et al.* 2011) e Batesiano, a camuflagem (SCOBLE 1995, EDMUNDS 1974), o aposematismo e a chamada camuflagem química, que tornam as larvas indetectáveis pelas formigas devido a sua semelhança química com o substrato (PORTUGAL & TRIGO 2005), e o disfarce em objetos não comestíveis. Como defesas secundárias: morder o predador potencial, debater-se, regurgitar, e /ou atirar-se da folha e permanecer pendurada por um fio de seda e as especializações epidérmicas relacionadas à defesa. Estas últimas variando desde simples cerdas a estruturas mais complexas em forma de espinho (escolos), ou até mesmo glândulas especializadas que secretam substâncias nocivas aos seus potenciais predadores e parasitoides (SALAZAR & WHITMAN 2001, STEHR 1987), assim como substâncias aliciadoras aos seus possíveis predadores (DE VRIES 1991, MONTEIRO 2000, HALL *et al.* 2004, KAMINSKI 2008a, 2008b).

1.1.2 Glândulas exócrinas da larva

Vegliante e Hasenfuss (2011), em trabalho de revisão sobre morfologia e diversidade de glândulas exócrinas em larvas de lepidópteros, relatam a existência de 21 tipos glandulares e de 13 estruturas supostamente exócrinas. Dentre os tipos glandulares abrangidos, são relatadas prováveis estrutura e função das glândulas mandibulares, labiais (de seda), de Verson, osmeterium, órgãos mimercófilos, glândulas de cera, de feromônio de trilha, cianogênicas, epicranial, e cerdas glandulares nos escolos de veneno. Dentre estas estão relacionadas com a defesa, as glândulas mandibulares, com a produção de secreção defensiva contra formigas e fungos patogênicos (algumas larvas de lepidópteros); as glândulas de Verson, que liberam sua secreção diante distúrbio (s) (maioria das larvas; diferenciadas em *Lymantriinae*); o osmeterium, que produz a secreção em resposta à perturbação mecânica ou espontaneamente, repelindo formigas (*Papilionidae*); os órgãos mimercófilos, que secretam fluidos nutritivos, que são avidamente consumidos por formigas que em troca protegem as larvas (*Lycaenidae* e *Riodinidae*); as glândulas cianogênicas, com um par de protuberâncias em cujo ápice pode-se encontrar secreção defensiva (*Thyrididae*); a glândula epicranial, que quando o animal é perturbado, emitem uma gota de secreção a partir de um poro localizado no epicrânio que repele formigas e vespas parasitas (larvas de algumas espécies de *Morpho* Fabricius, 1807); as cerdas glandulares dos escolos venenosos (maioria das larvas urticantes; incluindo *Megalopygidae*); e a glândula adenosma ou jugular, que libera, por exemplo, secreção (*Notodontidae*) ou voláteis (*Nymphalidae*), contra predadores (presente em *Yponomeutidae*, *Noctuoidea*, *Hesperiidae*, e *Papilionoidea*). Craig (1997) relaciona a seda produzida pelas glândulas labiais da larva de lepidópteros com a função de proteção e defesa.

1.1.2.1 A glândula adenosma ou jugular

A nomenclatura, adenosma ou jugular foi adotada para a (s) glândula (s) localizada (s) no prosterno da larva de Lepidoptera de todas as espécies citadas, conforme definido em Vegliante e Hasenfuss (2011), excetuando-se a subespécie *H. erato phyllis*, para a qual se adotou a denominação de glândulas prosternais (BORGES *et al.* 2010).

A glândula apresenta formas e designações variadas (adenosma, jugular, glândula do pescoço, ventral, cervical, torácica, eversível, protorácica ou protorácica ventral), é comum em algumas famílias de Lepidoptera, incluindo Nymphalidae (PETERSON 1962, STEHR 1987, MILLER 1991), apresenta uma distribuição sistemática dispersa em alguns Yponomeutidae, Noctuoidea (Notodontidae, Noctuidae), HesperIIDae e Papilionoidea (Nymphalidae, Pieridae) (PETERSON 1962, MILLER 1991, BOURGOGNE 1951, DEVRIES & MARTINEZ 1993). Apresenta-se como uma estrutura tubular-saculiforme, que se abre ventralmente em T1 (protórax), anterior às pernas e sugere-se, com isto, que nem todas as glândulas descritas possam ser homólogas (VEGLIANTE & HASENFUSS 2011), e que novos estudos e comparações devam ser realizados (BORGES *et al.* 2010).

Particularmente em Yponomeutidae, a glândula não é eversível e abre-se sobre uma saliência móvel cônica da parede do corpo (POVEL & BECKERS 1982), com um par de músculos inseridos próximo ao orifício (SCHAFFER 1889). Em outras famílias, apresenta-se como uma invaginação da parede do corpo ao redor do orifício, formando um vestibulo, que pode ser evertido por um aumento na pressão hidrostática e retraída por seus pares de músculos originados na cabeça e/ou em T1 (DETWILER 1922, MARTI & ROGERS 1988). Em alguns Noctuoidea e Nymphalidae, há inserção de músculos extrínsecos na parte glandular (MARTI & ROGERS 1988, KLEMENSIEWICZ 1883), o que pode ser ativamente evertida por alguns Nymphalidae (FANFANI & DAZZINI 1989).

1.1.2.1.1 Função e composição química da secreção

Para a maior parte dos Notodontidae, Nymphalidae, e possivelmente Noctuidae (MARTI & ROGERS 1988), a glândula é usada para defesa; quando a secreção é lançada contra o inimigo (DETWILER 1922, MARTI & ROGERS 1988, KLEMENSIEWICZ 1883, FANFANI & DAZZINI 1989, PERCY & MACDONALD 1979, OSBORN *et al.* 1999) ou evapora, difundindo voláteis repelentes a formigas e em muitos casos desagradáveis ao olfato humano (DEVRIES & MARTINEZ 1993, OSBORN *et al.* 1999, OSBORN & JAFFÉ 1998). As larvas de *Cerura vinula* Linnaeus, 1758 (Notodontidae), adicionam a secreção da glândula na seda de seus casulos (BYERS & HINKS 1976). Alguns riodinídeos usam-na para a comunicação simbiótica com formigas (DEVRIES *et al.* 2004, KAMINSKI 2008a). A glândula de yponomeutídeos não secreta feromônios de trilha (ROESSINGH 1990) e sua função é desconhecida.

A composição química da secreção é variada, formada por ácidos carboxílicos em nymphalídeos (OSBORN & JAFFÉ 1998), por ácido fórmico em notodontídeos e um noctuídeo (MARTI & ROGERS 1988, NAKAMURA 1998), outras são formadas por, álcoois e ésteres em um notodontídeo (HALLBERG & POPPY 2003), ou hidrocarbonetos de cadeia simples e terpenos em um noctuídeo (SEVERSON *et al.* 1991).

1.1.2.1.2 A glândula adenosma ou jugular – Nymphalidae

Nas subfamílias Acraeinae e Brassolinae, a glândula exibe plasticidade morfológica e, possivelmente fisiológica. Apresenta-se como uma projeção vermelha, anterior às pernas protorácicas (terceiro, quarto e quinto instar) em *Caligopsis seleucida* Hewitson, 1877 (Nymphalidae, Brassolinae) (FURTADO & CAMPOS-NETO 2004). Para *Actinote carycina* Jordan, 1913 (Nymphalidae, Acraeinae) corresponde a uma dobra no tegumento quando em repouso, em direção às peças bucais, localizada ventralmente entre a cabeça e o primeiro par de pernas (segundo instar, sem referência para o estágio anterior e posteriores) (PALUCH *et*

al. 2001). Em *Caligo teucer* Linnaeus ,1758 (Nymphalidae, Brassolinae), mostra-se como uma glândula eversível de mesma coloração que a parte ventral do corpo, entre as pernas protorácicas (primeiro instar, sem referência aos estágios posteriores) (SOUZA et al. 2006).

Em Heliconiinae, de acordo com OSBORN e JAFFÉ (1998), foram feitas análises químicas da glândula da larva de quinto instar de *Dione juno* Cramer, 1779 e *Abanante hylonome* Doubleday, 1844, cujos resultados demonstraram a existência de compostos defensivos como: ácido acético, ácido linoleico e ácido palmítico. Ainda foram feitos bioensaios comportamentais com formigas e as larvas, onde não ficou comprovada a função defensiva do extrato da glândula, devido, possivelmente, ao extrato estar muito diluído. Os comportamentos padronizados para identificar a repelência das formigas a compostos comerciais foram: (1) Antenação: direcionamento das antenas das formigas em direção à larva, mantendo uma distância maior de um milímetro. (2) Explorar: formigas tocam a larva com a ponta de suas antenas e imediatamente se afastam. Foram ainda estabelecidos padrões para os comportamentos de: (3) Inspeção: as formigas tocam a larva por um período maior de um segundo. (4) Ataque: formigas mordem a larva com suas mandíbulas ou picam a larva, arrastando-a por toda a arena de forrageamento. (5) Ignorar: as formigas não respondem à presença da larva. (6) Circulando alarmadas: formigas abrem suas mandíbulas ou aumentam o abdome enquanto correm em círculos irregulares em torno da área de forrageamento com um aumento acentuado na velocidade de movimentos. (7) Tremendo alarmadas: formigas vibram rapidamente com as suas mandíbulas abertas. Elas podem estar fixas ou correndo em círculos como para o comportamento seis. (8) Limpeza do par de antenas e do primeiro par de pernas: formigas passam as antenas e primeiro par de pernas entre as mandíbulas.

1.1.2.2 As glândulas prosternais

Recentemente descritas as glândulas exócrinas prosternais da larva de *H. erato phyllis*, são de dois tipos, uma composta de um par de unidades elipsoides, denominadas glândulas pareadas, associadas ao saco cônico tegumentar que se

projeta no protórax, permitindo a expulsão da sua secreção através de ductos finos que se abrem em poros nas superfícies laterais do saco. Este saco everte por pressão hidrostática interna. O outro tipo é formado por uma única bolsa secretora na porção anterior do prosterno, denominada glândula ímpar, cuja secreção é expelida diretamente pela cutícula, por meio de micro cisternas na superfície externa das células glandulares e eliminada através de uma fenda transversal, acima do limite superior do saco em forma de cone. As margens da fenda apresentam várias cerdas, estas provavelmente funcionam como proprioceptoras.

A análise histológica das glândulas e da superfície da área em microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, demonstra que as unidades glandulares das glândulas pareadas são constituídas por epitélio simples colunar alto, e que a unidade da glândula ímpar é constituída por epitélio simples colunar baixo. Nas glândulas pareadas a secreção é amorfa e acidófila, armazenadas na luz das unidades secretoras, enquanto na glândula ímpar é amarelada e aparentemente solidificada, em pequenos fragmentos individuais, na superfície cuticular das células glandulares, quando fixada em líquido de Dietrich e preservada em etanol. Na microscopia eletrônica de varredura esta última aparece como pequenas quantidades de material pastoso que saem de muitas micro cisternas que cobrem a superfície cuticular da célula secretora.

A função das glândulas ainda não está esclarecida, mas é sugerido que esteja associada à defesa da larva. Observou-se uma atitude de defesa na larva quando esta tem a parte frontal da cabeça tocada com os pelos de um pincel, esta ergue o protórax e baixa rapidamente a cabeça até tocar nos pelos do pincel. Como as glândulas prostenais estão nesta região ventral e anterior do protórax aventou-se a possibilidade de estarem envolvidas na defesa da larva contra possíveis ataques de predadores (BORGES *et al.* 2010).

As glândulas prosternais estão associadas ao saco cônico tegumentar, estrutura esta que foi, possivelmente, determinante para as várias denominações encontradas na literatura para designar uma ou mais glândulas localizadas no prosterno (adenosma, jugular, etc.); mas, o saco em si não é uma unidade glandular. Borges *et al.* (2011) sugerem que as glândulas prosternais são encontradas em todos os estágios larvais de *Heliconius* e que necessitam de investigação sobre a variação em relação às suas unidades glandulares e sobre o estabelecimento de

homologias entre as famílias de lepidópteros. Os autores propõem a denominação de glândulas prosternais devido a sua localização, e argumentam serem inconsistentes as outras terminologias aplicadas, pois estas se referem a funções e estruturas que não podem ser generalizadas (por exemplo: adenosma) e a partes não específicas de localização no corpo da larva (por exemplo: ventral, cervical, protorácicas, pescoço). Assim, a denominação de glândulas prosternais, as relaciona com o esterno do protórax (= prosterno), o local do corpo onde elas são, de fato, localizadas. Do mesmo modo, este termo não implica no número ou na forma das suas unidades de secretoras, nem na função e na natureza química da sua secreção.

2 OBJETIVOS

2.1 O objetivo geral

Analisar a existência de eventuais secreções nas glândulas prosternais: glândula ímpar e glândulas pareadas, da larva de *H. erato phyllis*, e verificar o modo de ação destas secreções.

2.2 Os objetivos específicos

- Extrair as glândulas prosternais (ímpar e pareadas) produtoras de secreção através da dissecação de larvas;
- Extrair os possíveis compostos químicos das unidades glandulares;
- Extrair eventuais voláteis através de aerações;
- Detectar a composição química das unidades glandulares;
- Verificar o modo de ação destas glândulas na defesa contra predadores.

3 METODOLOGIA

Após a construção de insetário, obtenção e adaptação de fêmeas para a postura e obtenção das larvas, iniciaram-se os procedimentos de dissecação das glândulas pareadas e impar; preparação dos extratos por extração por solvente e aerações; as análises químicas e bioensaios comportamentais.

Na extração por solvente, as unidades glandulares são colocadas em recipiente de vidro com hexano por um período de 2h. Nas aerações, larvas vivas são aeradas, com e sem mudas de *P. edulis* e com e sem estímulo de ataque, em câmaras de vidro; os voláteis são capturados e concentrados em hexano. Os extratos resultantes de aerações e da extração por solvente são analisados em CG, para avaliar-se a existência de compostos voláteis ou não e a concentração, e no CG-EM, para avaliar-se a composição dos compostos existentes.

Os bioensaios procuraram comprovar a existência de resposta comportamental de defesa da larva, frente a estímulos de ataque, na qual estejam envolvidas as glândulas prosternais pareadas, devido a sua estrutura de eliminação de secreção. A metodologia aqui relatada encontra-se resumida na (FIGURA 1).

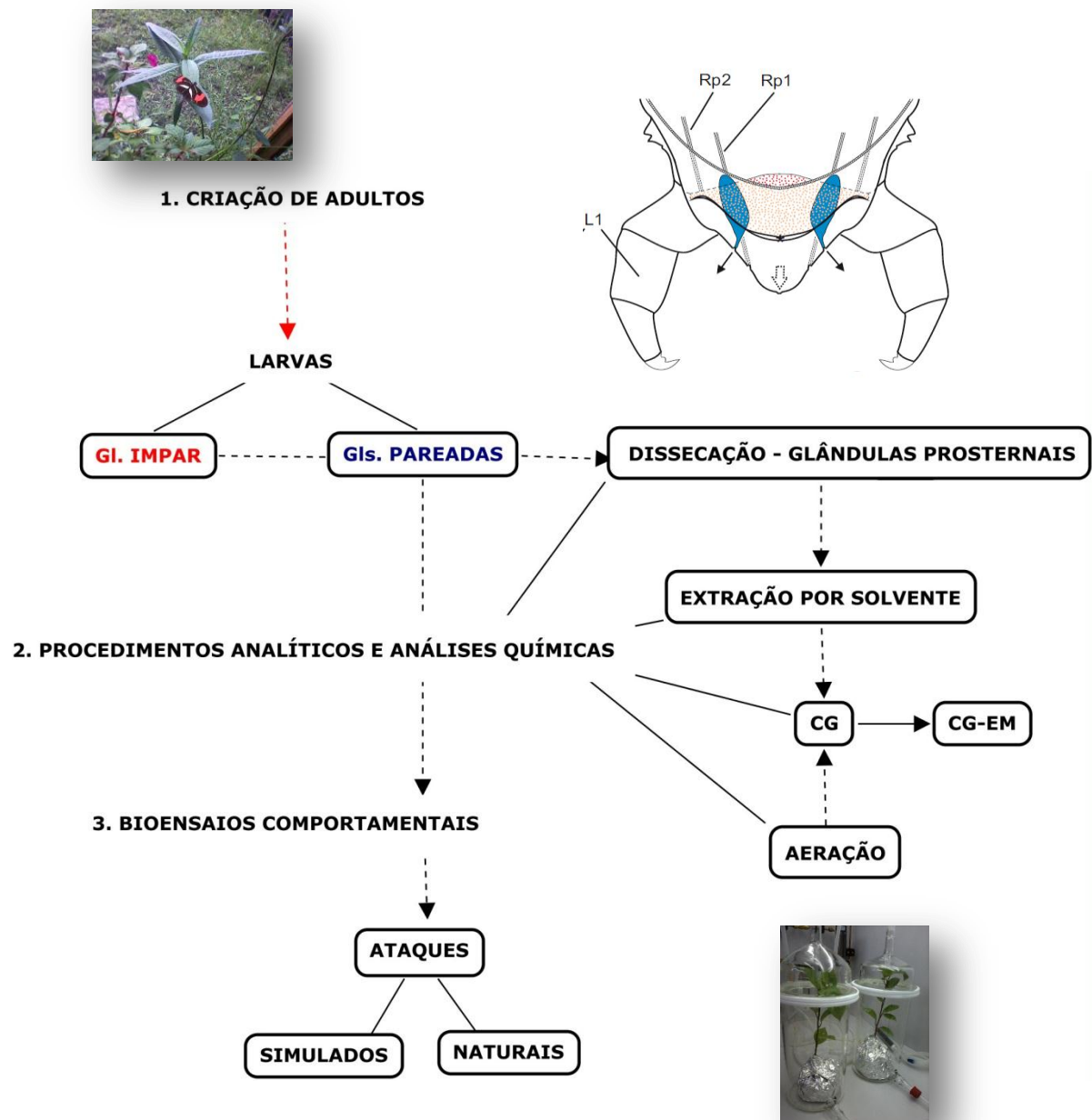


FIGURA 1. Resumo esquemático da metodologia de análise das glândulas prosternais pareadas e impar da larva de *H. erato phyllis*.
 FONTE: O autor (2010).

3.1 Criação e manejo de adultos e larvas de *H. erato phyllis*

Período: Dezembro/2010 à Junho/2011

Objetivo: obter exemplares dos cinco instares larvais de *H. erato phyllis* para os experimentos analíticos, análises químicas e bioensaios comportamentais.

Um insetário foi construído em área reservada do Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil, com 2 m de altura, 2 m de largura e 2,5 m de comprimento, com suporte em madeira e revestido por tela sombrite, que permite a passagem de 30% da luz solar direta (FIGURA 2A). Este foi utilizado como ambiente de condições seminaturais para a manutenção de plantas hospedeiras, dos adultos e oviposição (FIGURA 2B).

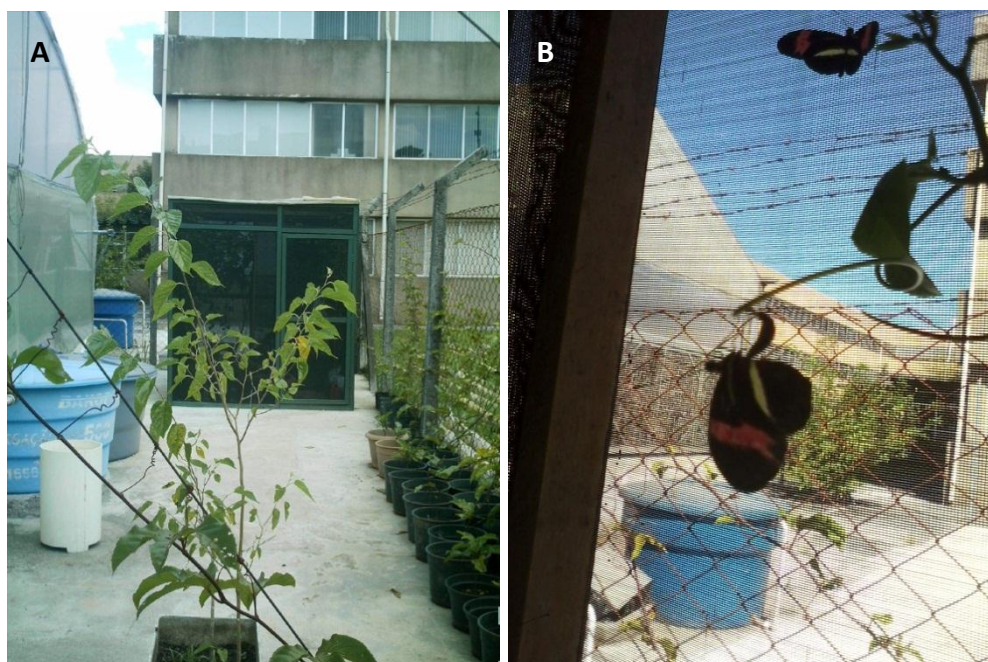


FIGURA 2. A, vista do insetário ao fundo. B, oviposição da fêmea de *H. erato phyllis*.
FONTE: O autor (2011).

Para tanto foram colocados no seu interior, vasos com mudas de *P. edulis* e *P. actinia*, de maneira que eram disponibilizados cinco ramos para postura para cada fêmea (FIGURA 3A). Ainda foram inseridos recipientes para a dieta artificial (BORGES *et al.* 2010) e vasos com plantas psicófitas, *L. camara* e *I. walleriana*, para a alimentação natural (FIGURA 3B).



FIGURA 3. A, passifloráceas no interior do insetário. B, flores de plantas psicófilas (*L. camara* e *I. walleriana*) utilizadas como fonte de alimentação natural dos adultos de *H. erato phyllis*.
FONTE: O autor (2011).

As fêmeas foram capturadas na área de mata nativa do Centro Politécnico da UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil e da Reserva Ambiental Serelepe, Quatro Barras, Paraná, Brasil. Foram marcados na asa anterior direita (FIGURA 4), com caneta atóxica, sendo registrado o número do espécime, o sexo e identificação do local de origem.

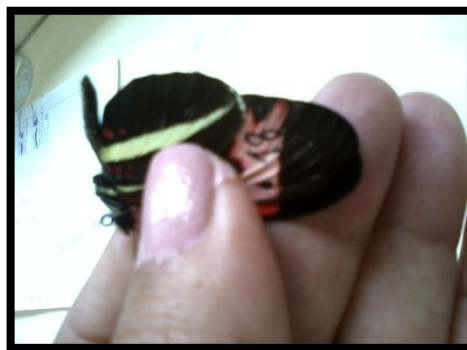


FIGURA 4. Adulto de *H. erato phyllis* identificado com caneta atóxica na asa direita.
FONTE: O autor (2011).

Sementes de *P. edulis*, foram cultivadas e mudas foram transplantadas para vasos (FIGURA 5A), mantidos em condições naturais, em área aberta e reservada, cujas folhas e ramos foram fonte alimentar de larvas na sala de criação (FIGURA 5B).



FIGURA 5. A, mudas de *P. edulis*. B, frascos com folhas e larvas.
 FONTE: O autor (2011).

O manejo dos adultos de *H. erato phyllis* deu-se no insetário, com troca diária de alimentação artificial segundo Borges *et al.* (2010) e coleta de ovos (FIGURA 6).



FIGURA 6. A, alimentação artificial de adultos de *H. erato phyllis*. B, coleta de ovos.
 FONTE: O autor (2011).

Ovos e larvas obtidos foram mantidos em condições seminaturais em sala de criação. Os ovos coletados eram colocados em placas de *Petry* forradas com papel filtro umedecido em água destilada. As larvas eclodidas foram colocadas em ramos e folhas de *P. edulis*, mantidas em frascos plásticos com água, sendo todo o

conjunto envolto em sacos de tecido poroso (FIGURA 7A), de onde eram retiradas de acordo com o instar desejado (FIGURA 7B).



FIGURA 7. A, frascos para manutenção de larvas de *H. erato phyllis*. B, sala de criação.
FONTE: O autor (2011).

3.2 Manejo dos adultos operários de *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae)

Objetivo: fornecer exemplares de *T. melanocephalum*, para a realização de bioensaios comportamentais.

As formigas operárias foram capturadas na sala de criação do CP, UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil, com iscas de peixe (*Sardinella brasiliensis* Steindachner, 1879) em óleo comestível (FIGURA 8A). Após, foram mantidas em recipiente fechado de plástico, de 18 cm de comprimento, 8 cm de altura e 14 cm de profundidade, com pequenos orifícios; em condições seminaturais de temperatura e umidade, de onde eram coletadas em horários padronizados para a realização dos bioensaios (FIGURA 8B). Foram alimentadas diariamente com iscas de peixe em óleo comestível e a água foi fornecida por um frasco plástico aberto contendo algodão umedecido. O alimento era retirado 48 horas antes da realização dos bioensaios.

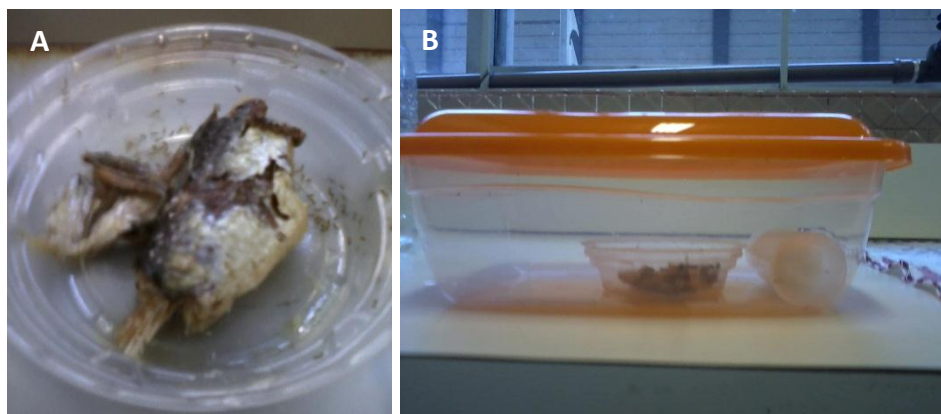


FIGURA 8. A, armadilha para captura de formigas *T. melanocephalum*. B, recipiente plástico para manutenção de formigas *T. melanocephalum*.
FONTE: O autor (2011).

3.3 Procedimentos analíticos e análises químicas

3.3.1 Extração por solvente

3.3.1.1 Dissecação

Objetivo: dissecar a larva e extrair as unidades secretoras das glândulas prosternais para preparação dos extratos.

As larvas dos diferentes instares foram coletadas durante a fotofase e escotofase, em intervalos de tempo regulares. As glândulas ímpar e pareadas foram dissecadas em estereomicroscópio Quimis®.

A glândula ímpar foi seccionada a partir da fenda transversal e colocada em hexano e em éter, em concentrações variadas de 1-15 unidades em 10 microlitros (μL) de hexano, durante 2h. As glândulas pareadas foram extraídas a partir da parede do saco eversível, de maneira que os ductos com as unidades secretoras fossem extraídos e colocados em hexano e em éter, em concentrações variadas de 1-15 unidades em 10 μL de hexano, durante 2h (FIGURA 9). Os extratos obtidos com diferentes concentrações foram analisados em CG e CG-EM.

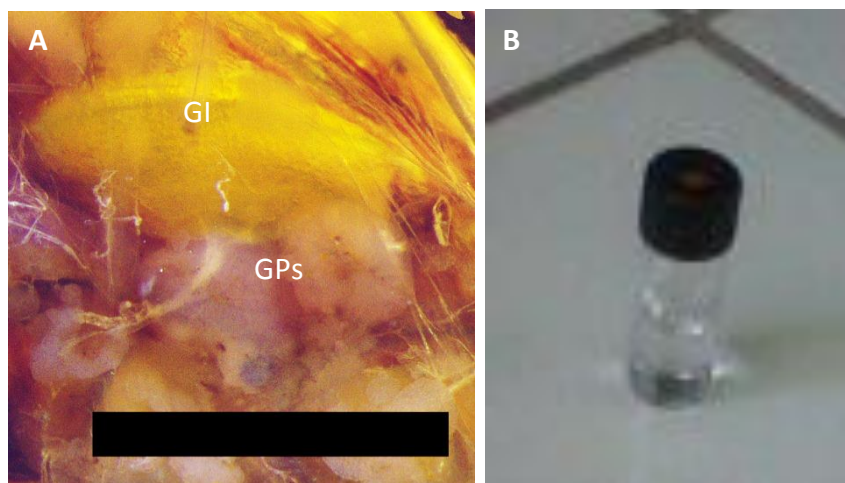


FIGURA 9. A, vista interna da região prosternal, (GI) glândula ímpar e (GPs) glândulas pareadas. Aum.= 50x. Barra= 1 mm. B, frasco para preparação de extrato. FONTE: O autor (2011).

3.3.2 Aeração

Objetivo: verificar a existência de produção de voláteis, com e sem estímulos artificiais provocadores, pelas glândulas prosternais da larva de *H. erato phyllis*, sob muda da planta hospedeira; e sem a planta hospedeira.

Consistiu na comparação de 24, 48 e 72h e com e sem estímulo provocador, dos voláteis coletados de larvas em mudas de *P. edulis* com os voláteis coletados das mudas de *P. edulis* (FIGURA 10A), e na comparação de 24, 48 e 72h dos voláteis coletados de larvas envoltas em tecido poroso, com os voláteis coletados do tecido poroso (FIGURA 10C). Para tanto foram utilizadas câmaras de aeração, com filtro adsorvente em uma extremidade e uma fonte constante de ar filtrado na outra. Os extratos eram obtidos a partir da lavagem do filtro adsorvente com hexano (FIGURA 10B) e posterior concentração (50µL ou 50%) para análises químicas em Cromatógrafo Gasoso (CG).

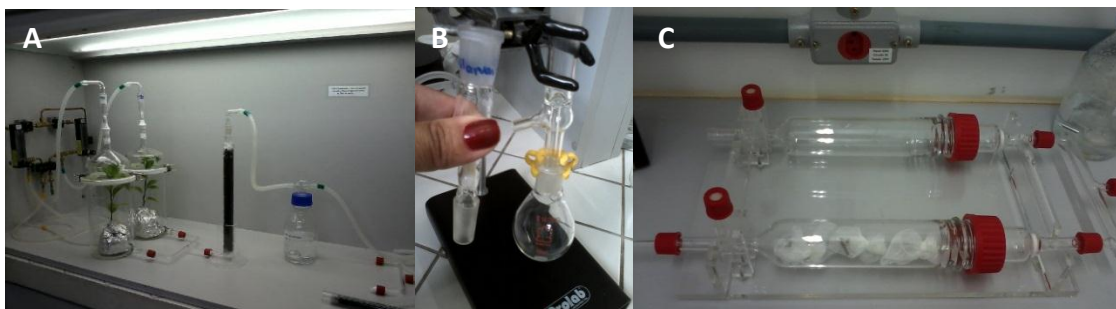


FIGURA 10. A, sistema de aeração de planta (muda de *P. edulis*) e larva de *H. erato phyllis*. B, preparação do extrato. C, sistema de aeração de larvas de *H. erato phyllis*.
 FONTE: O autor (2011).

3.3.3 Métodos de análises dos extratos

3.3.3.1 Cromatografia gasosa (CG)

Objetivo: verificar a existência de voláteis e a concentração dos compostos nos extratos das glândulas prosternais.

Os compostos foram analisados pelo cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu QP-2010 Plus (FIGURA 11A), equipado com uma coluna capilar RTX-5 (30 milímetros × 0,25 milímetros × 0,25 milímetros) (Restek, Bellefonte, Pensilvania, EUA), com detector de ionização em chama (FID). A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por três minutos. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se desta forma por 5 minutos.

3.3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Objetivo: verificar a composição química dos extratos das glândulas prosternais.

Os compostos foram analisados pelo cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP-2010 Plus (FIGURA 11B),

equipado com uma coluna capilar RTX-5 (30 milímetros × 0,25 mm × 0,25 milímetros) (Restek, Bellefonte, Pensilvania, EUA), com detector de ionização em chama (FID). A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por três minutos. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C/min até alcançar 250 °C, mantendo-se desta forma por 5 minutos.

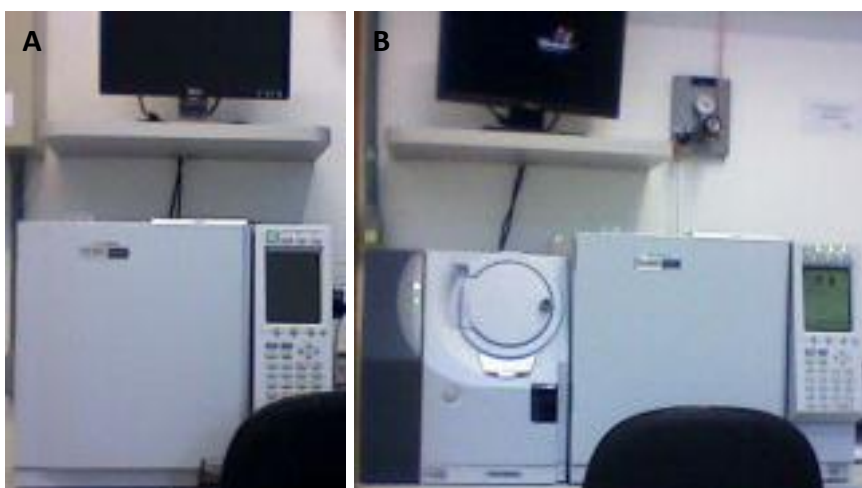


FIGURA 11. A, CG. B, CG-EM.
FONTE: O autor (2011).

3.4 Bioensaios – Experimentos comportamentais

3.4.1 Glândulas pareadas

3.4.1.1 Ataques naturais e simulados

Objetivo: avaliar a contribuição das secreções das glândulas pareadas, da larva de *H. erato phyllis*, como possíveis detentoras de compostos químicos de defesa.

a) Simulação de ataques

Foram realizadas filmagens das larvas em situação de provocação artificial. Nas filmagens utilizou-se um foco de luz projetado sobre a larva de quinto instar, filmou-se durante 30s com câmera filmadora modelo JVC® GZ-HM320SUB GZ-HM320SUB Prata Full HD, utilizou-se estímulos de provocação artificial que

constavam de movimentos de toque com a parte das fibras de um pincel sobre a cabeça e região dorsal do corpo da larva, manteve-se a larva na posição horizontal, sobre uma folha de *P. edulis*. O fundo preto foi utilizado.

b) Observação de ataques naturais

Nas observações diretas com estímulos de provocação naturais, todos os instares entraram em contato com espécimes vivas de *T. melanocephalum*. Em particular uma larva de quarto instar e uma de terceiro instar, ambas em um recipiente de vidro fechado, que continha algodão e pouca quantidade de éter etílico, entraram em contato com *T. melanocephalum* e acrescentaram um comportamento diferenciado ao observado em todos os instares.

4 RESULTADOS

4.1 Criação e manejo de adultos e larvas de *H. erato phyllis*

4.1.1 Insetário, sala de criação

De Fevereiro a Maio de 2011 foram conservados em média cinco adultos fêmeas (FIGURA 12) no insetário.

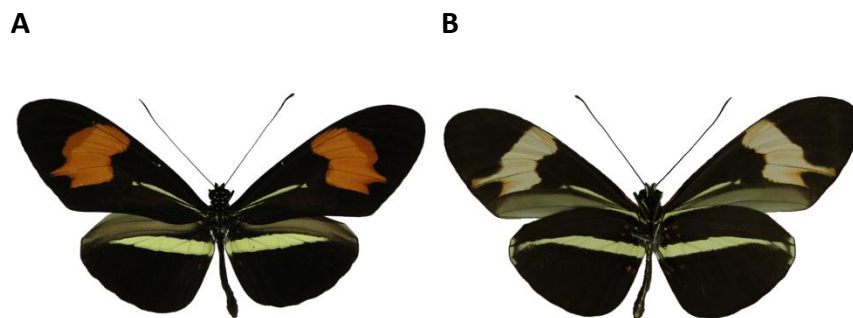


FIGURA 12. A, vista dorsal do macho de *H. erato phyllis*, onde se observa as características morfológicas que identificam a espécie. B, vista ventral.
FONTE: Dayana Bonfanti (2011).

Nos meses de Fevereiro, Março, e Abril ocorreram posturas com maior número de ovos, que corresponderam às maiores temperaturas observadas. Em média foram liberados trinta adultos, emergidos na sala de criação, no período (GRÁFICO 1).

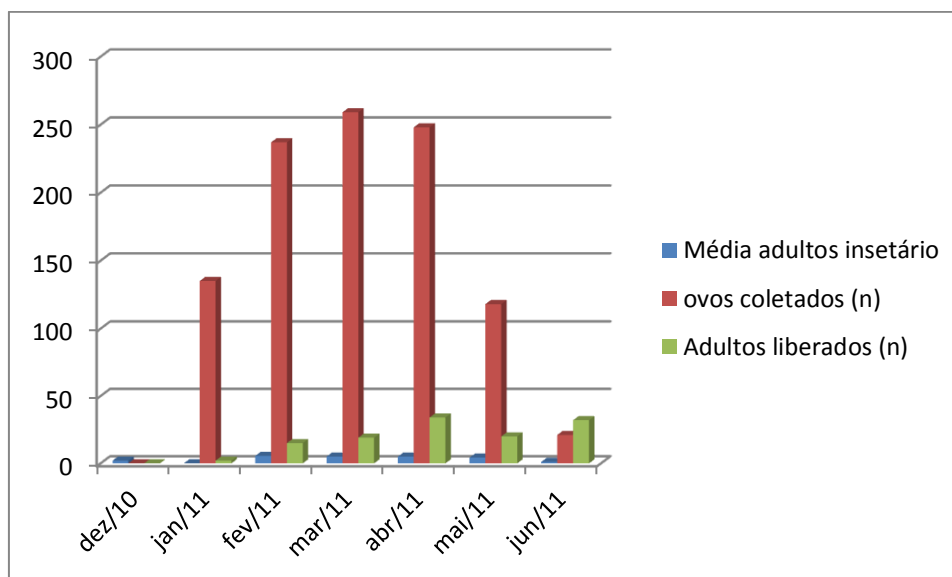


GRÁFICO 1. Dados quantitativos de ovos coletados, adultos emergidos liberados e da média de adultos no insetário durante o período de criação (2011).

FONTE: O autor (2011).

4.1.2 Relações interespecíficas

Formigas *T. melanocephalum* (FIGURA 13) foram observadas, na sala de criação, predando todos os instares larvais e adultos debilitados de *H. erato phyllis*, em número crescente com relação ao instar larval. Enquanto um espécime predava uma larva de primeiro instar, várias (aproximadamente quatorze) predam uma larva de quinto instar e um adulto debilitado.



FIGURA 13. *T. melanocephalum*. Aum.= 50x. Barra= 1mm.
FONTE: O autor (2011).

No insetário, uma aranha do gênero *Araneus* Clerk, 1757 (FIGURA 14) predou três adultos através do uso de armadilha que consistiu em fios de seda dispostos transversalmente entre as folhas. Em uma folha dobrada a aranha aguardava suas presas. Após serem pegas as borboletas foram enroladas nos fios de seda para posterior consumo.



FIGURA 14. *Araneus* sp.. Aum.= 10x. Barra= 1mm.
FONTE: O autor (2011).

4.2 Análises químicas

4.2.1 Extração por solvente

A comparação de 74 análises CG, 10 análises CG-EM, dos extratos das glândulas Impar e Pareadas dissecadas, em concentrações variadas (de 1-15 unidades em 10µL de hexano), a cada 2h durante fotofase e escotofase, evidenciaram que as glândulas prosternais não produzem voláteis de defesa.

A análise química de dois extratos de cada tipo glandular, com concentração de 15 unidades em 10µL de hexano, demonstraram que a glândula impar (FIGURA 15) e as glândulas pareadas (FIGURA 16) produzem um conjunto de compostos complexos semelhantes, como ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeias curtas e longas.

As possíveis secreções resultantes desta composição podem ser: óleos, açúcares e fibras. Comparações com a MEV e o modo de eliminação das secreções revelam que a produção de óleo é compatível com ambas as glândulas prosternais.

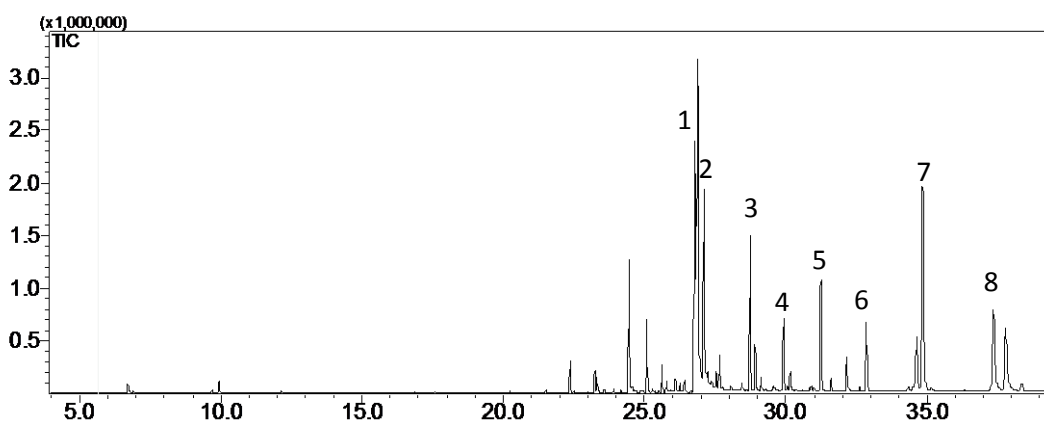


FIGURA 15. Cromatograma do extrato da glândula prosternal impar. 01-02=ácidos graxos, 03-08=hidrocarbonetos de cadeias variadas.
FONTE: O autor (2011).

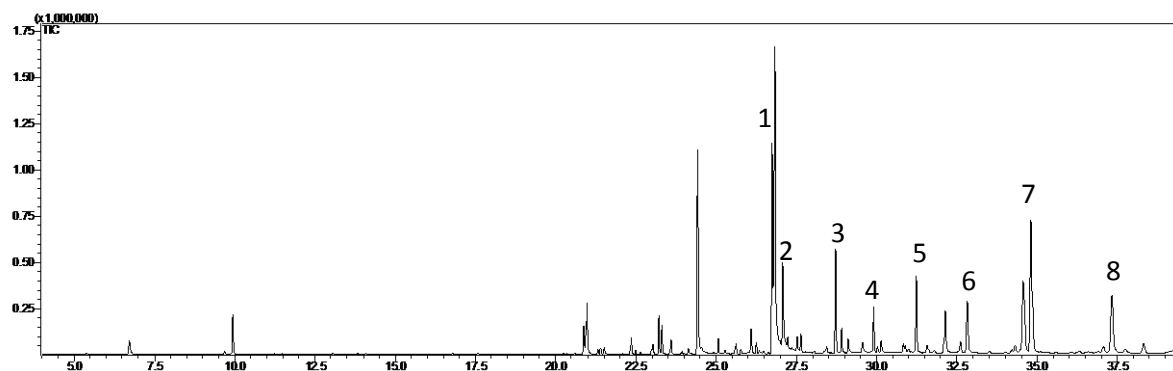


FIGURA 16. Cromatograma do extrato das glândulas prosternais pareadas. 01-02=ácidos graxos, 03-08=hidrocarbonetos de cadeias variadas.
FONTE: O autor (2011).

4.2.2 Aerações

A comparação entre vinte e uma análises CG, seis análises CG-EM, com e sem estímulo provocador artificial, dos voláteis coletados em adsorventes provenientes de aerações de larvas em mudas de *P. edulis* com os voláteis coletados em adsorventes das mudas de *P. edulis*, e a comparação entre nove análises CG e duas análises CG-EM dos voláteis coletados de larvas envoltas em tecido poroso, com os voláteis coletados do tecido poroso, confirmaram os resultados obtidos na extração por solvente sobre a não produção de voláteis de defesa (FIGURA 17).

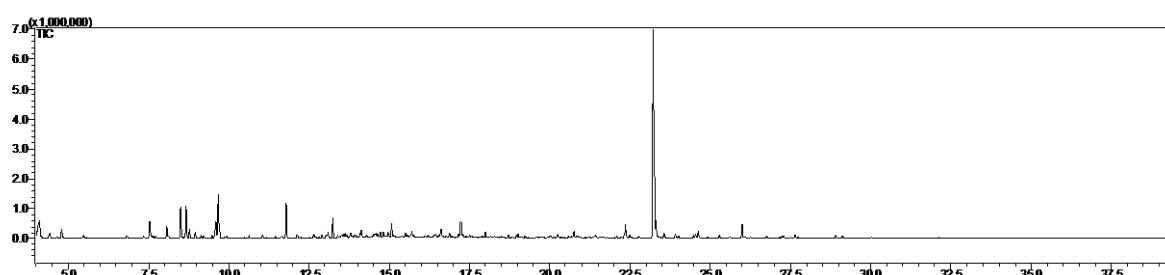


FIGURA 17. Cromatograma do extrato de planta com larva de quinto instar, resultante de aeração. Todos os picos correspondem a voláteis da planta.
FONTE: O autor (2011).

4.3 Bioensaios – Experimentos comportamentais

4.3.1 Glândulas Pareadas

4.3.1.1 Ataques naturais e simulados

Através de observações e filmagens constatou-se que as glândulas prosternais do tipo pareadas atuam juntamente com as glândulas labiais de seda promovendo provavelmente uma defesa químico-mecânica, utilizada como uma estratégia ativa da larva contra seus predadores, mais especificamente contra as formigas. Em sala de criação foi constatado que formigas da espécie *T. melanocephalum* predam ovos, larvas e adultos debilitados e com espaço reduzido para voo. Como produto da secreção das glândulas prosternais pareadas tem-se um jato, que inicialmente, sugere-se estar na forma semilíquida.

a) Respostas ao estímulo artificial

Todos os instares larvais apresentaram a mesma sequência de eventos comportamentais quando estimuladas artificialmente. Descrevendo-se a resposta da larva de quinto instar ao estímulo artificial de provocação: A larva inicialmente detecta o predador, dobra o tórax, várias vezes, com movimentos regulares, ficando com as pernas livres e virando a cabeça em direção ao objeto. Neste momento inicial a larva possui movimentos lentos e também procura deslocar-se no substrato. Mas com a constância dos movimentos de ataque, ela torna-se cada vez mais ativa, com movimentos do tórax mais incisivos. Após alguns minutos de ataque constante é possível observar o saco cônico tegumentar inflado (FIGURA 18 A). Este se apresenta como uma saliência de cloração semelhante a da cabeça, um pouco mais escura, de comprimento igual ou aproximado ao comprimento das pernas do primeiro segmento torácico. Em algumas ocasiões a larva deslocou-se pelo substrato mantendo o saco inflado e em outras foi possível observar o direcionamento de jatos de secreção glandular a partir dos poros das glândulas prosternais pareadas (FIGURA 18 B, C). Observando-se as imagens dos filmes

obtidos, nota-se que a secreção é eliminada dos dois poros ao mesmo tempo em direção dos fios do pincel, que representam o predador.



FIGURA 18. Larva de quinto instar de *Heliconius erato phyllis* detecta o predador (fios de um pincel), dirigindo lhe jatos da secreção das glândulas pareadas. A, a larva levanta o tórax exibindo o saco eversível inflado (ponta de seta preta) durante ataque artificial. B e C, sequência de imagens que mostram a liberação da secreção (pontas de setas pretas).
FONTE: O autor (2011).

Em outras situações foi observado que a larva também libera fios de seda, de suas glândulas labiais em direção ao predador (FIGURA 19 A), durante o ataque artificial. E, com o tórax erguido e as pernas livres, movimenta o tórax procurando acertar o alvo (FIGURA 19 B). Os jatos direcionam-se para a base do objeto (FIGURA 19 C). Após alguns minutos de ataques artificiais constantes e trabalho de defesa intensa da larva, esta dobra o tórax, o máximo para trás para ganhar impulso, e em seguida possivelmente descontraí a musculatura, desferindo um golpe certo com a cabeça no falso predador (FIGURA 19 D), ainda liberando fios de secreção das glândulas labiais e possivelmente também das glândulas prosternais pareadas.

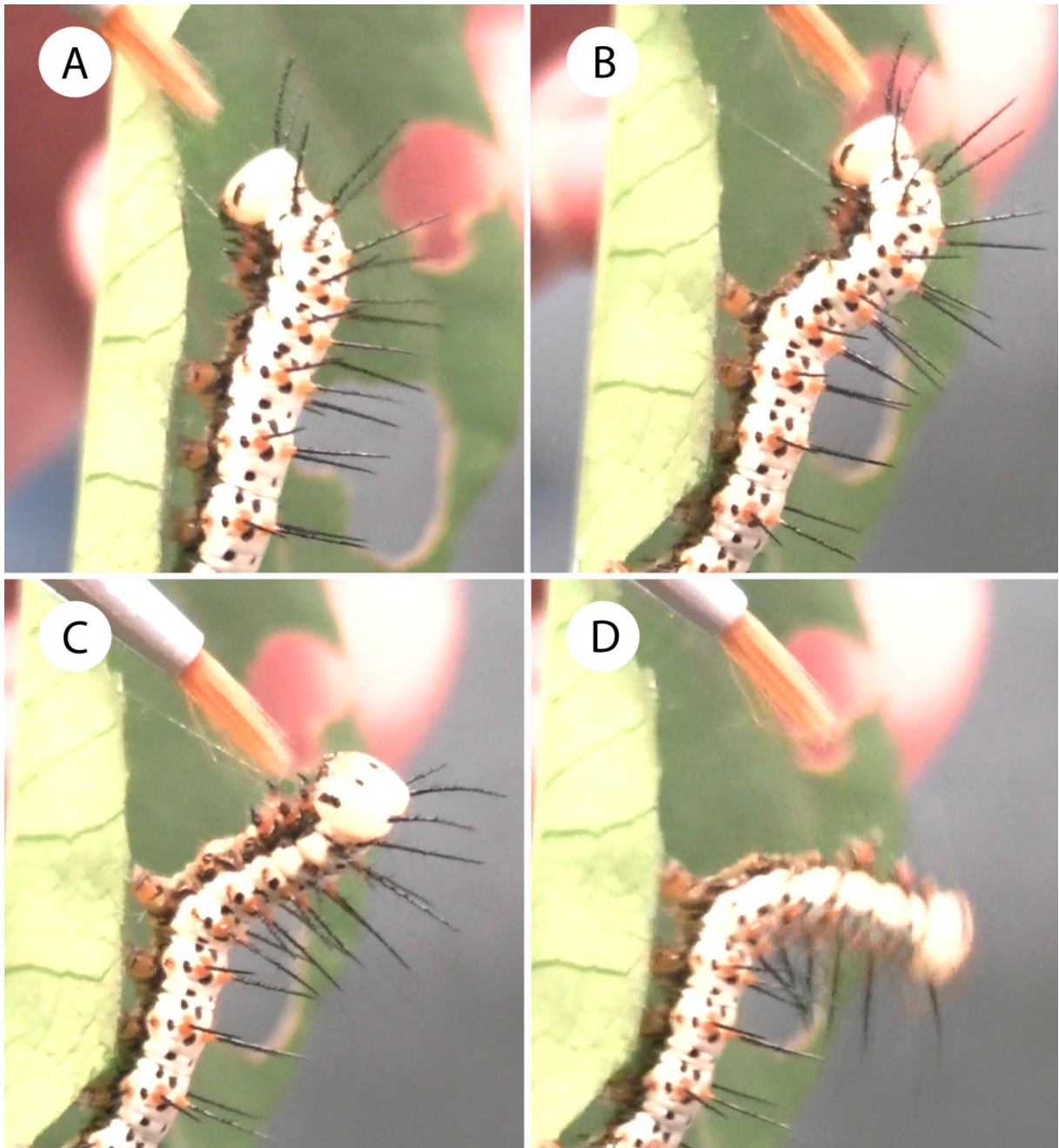


FIGURA 19. Larva de quinto instar de *Heliconius erato phyllis* durante o ataque artificial. A, a larva libera fios de seda das glândulas labiais para a base do objeto. B, a larva levanta o tórax, fica com as pernas livres e movimentando o tórax procurando acertar o alvo. C, a larva direciona os jatos de secreção das glândulas prosternais e fios de seda para a base do objeto. D, a larva levanta o tórax, dobrando-o o máximo para trás, e com as pernas livres, desfere um golpe com a cápsula cefálica no objeto, ainda liberando fios de seda e possivelmente de secreção das glândulas pareadas prosternais.

FONTE: O autor (2011).

Em outras ocasiões, a larva, após um comportamento de resistência frente ao ataque, com o tórax erguido e cabeça direcionada para o falso predador, regurgita e morde o objeto que a incomoda (FIGURA 20).



FIGURA 20. Larva de quinto instar de *Heliconius erato phyllis* durante ataque artificial, a larva regurgita e morde o objeto que a incomoda (fios de um pincel).
FONTE: O autor (2011).

b) Respostas ao estímulo natural

Tendo-se a formiga *T. melanocephalum* como estímulo natural, foi possível observar que todos os instares larvais apresentaram a mesma sequência de eventos comportamentais descrita para o estímulo artificial, e particularmente em uma larva de quarto instar e em uma de terceiro instar, que após apresentarem a sequência de eventos comportamentais descrita, aproximaram-se, e com o auxílio das pernas enrolaram a formiga com os fios de secreção formando uma pequena esfera. Após, esta foi conduzida, com a ajuda das pernas e larvópodos, em direção ao último segmento larval.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que as glândulas pareadas têm função de defesa, enquanto que a função glândula ímpar não pode ser determinada. A função de defesa direta contra predadores não é presumível para a glândula ímpar, pois sua estrutura e abertura para eliminação da secreção (fenda) não fornecem indícios para uma exteriorização prática do produto com fins de defesa ativa, o que sua consistência possivelmente pastosa, evidenciada em MEV, corrobora. Deste modo, analisando-se as possíveis alternativas para a não repelência do extrato da glândula ímpar, sugere-se novas investigações. Os estudos químicos foram pouco aprofundados nas glândulas prosternais ímpar e pareadas; avaliações químicas devem ser feitas para a completa elucidação das suas composições químicas. Nossas observações em campo e em laboratório sugerem que todos os instares larvais de *H. erato phyllis* apresentam um mesmo comportamento frente à ataques simulados e naturais, e que as unidades glandulares das glândulas pareadas atuam juntas, de forma independente e alternada, em combinação com as glândulas de seda da cabeça. Mas o sucesso sobre o predador depende do instar e fisiologia larval, e do tamanho, fisiologia e número de predadores. A emissão de secreção em direção à base do objeto que a perturba sugere um objetivo inicial de dificultar os movimentos dos possíveis predadores. Sugere-se que o fato de desferir de um golpe com a cabeça sobre o predador imobilizado, facilitaria o passo seguinte que consiste em enrolar a presa com fios de secreção, com a ajuda das pernas. O seu encaminhamento, através de movimentos das pernas até os larvópodos, e destes até o último segmento larval, sugerem que a esfera com o predador possa ser fixada em lugar próximo, com os fios produzidos pelas fiandeiras. Assim de acordo com a classificação de Gross (1993), a utilização das glândulas prosternais pareadas seria uma estratégia de defesa secundária, ou seja, que previne o ataque após a detecção de um predador potencial pela larva. Presume-se que o conjunto de caracteres morfológicos, fisiológicos e de comportamento adquiridos, permitiu aos seus possuidores, perseverarem em maior número no seu ambiente, determinando um valor adaptativo mais alto do que em indivíduos sem esta característica. Esta adaptação ao ambiente biológico, provavelmente, permitiu ao organismo ameaçado,

a larva, melhorar suas adaptações defensivas, e este carácter aumentando gradativamente de frequência na população determinou um maior valor adaptativo da subespécie. Evidências de existência de um saco cônico tegumentar na região do prosterno na larva de outras espécies e famílias de lepidópteros, permite sugerir a ocorrência de glândulas pareadas prosternais de defesa, o que contribuirá, possivelmente, para o desenvolvimento de um comportamento semelhante ao observado na larva de *H. erato phyllis*. Alguns ácidos graxos são considerados compostos defensivos das glândulas de outros heliconíneos, mas os exames iniciais realizados não revelam a existência dos mesmos nos extratos das glândulas pareadas e impar. Estudos anatômicos e funcionais comparativos das glândulas prosternais em outras taxa são necessários para futuras reconstruções filogenéticas. É importante ressaltar que mesmo nos casos nos quais as glândulas sejam consideradas possivelmente homólogas, estas podem desempenhar um papel diferente, dependendo da espécie. Assim estas novas investigações realizadas para elucidação destas suposições possibilitarão melhor conhecer estes possíveis mecanismos de defesa, que podem estar ocultos em outras taxa, indicados nos estudos de comportamento, morfologia e fisiologia das glândulas prosternais de imaturos de *H. erato phyllis*.

REFERÊNCIAS

- ANDO, Y. & T. OHGUSHI. 2008. Ant- and plant-mediated indirect effects induced by aphid colonization on herbivorous insects on tall goldenrod. **Population Ecology** **50**: 181–189.
- APPEL, A. G.; NA, J. P. S. & C. Y. LEE. 2004. Temperature and humidity tolerances of the ghost ant, *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** **44**(1): 89–100.
- BARROWS, E. M. 2000. **Animal behavior desk reference. A dictionary of Animal Behavior, Ecology, and evolution**. C.R.C. Press, 2nd Ed., 922 p.
- BENSON, W. W.; BROWN, K. S. Jr. & L. E. GILBERT. 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution** **29**: 659–680.
- BORGES, E. de O.; FACCIONE-HAUSER, M. C. & G. P. R. MOREIRA. 2010. Morphology of the prosternal glands of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Psyche**: Doi 10.1155/2010/892960
- BOURGOGNE, J. 1951. Ordre des Lépidoptères, p. 174–448. In: Masson et Cie (Eds.). **Traité de Zoologie: Anatomie Systématique, Biologie Volume 10(1)**. P. P. Grassé, Paris.
- BROWN JR., K. S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology** **26**: 427–457.
- BROWN JR., K. S. 1992. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal, p. 142–187. In: L. Morellato (Ed.). **História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Campinas, Editora da Unicamp, 321 p.
- BYERS, J. R. & C. F. HINKS. 1976. Fine structure of the midventral abdominal tracheal glands in banded woolly bear caterpillars (Arctiidae: Lepidoptera). **Canadian Journal of Zoology** **54**: 1824–39.

- CARDOSO, M. Z., ROPER, J. J. & L. E. GILBERT. 2009. Prenuptial agreements: mating frequency predicts gift-giving in *Heliconius* species. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **131**: 109–114.
- CORRÊA, C. A.; IRGANG, B. E. & G. R. P MOREIRA. 2001. Estrutura floral das angiospermas usadas por *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae). No rio grande do sul, brasil. **Iheringia Série Zoologia** **90**: 71–84.
- CRAIG, C. L. 1997. Evolution of arthropod silks. **Annual Review of Entomology** **42**:231–67.
- DAVIDSON, D. W.; COOK, S. C.; SNELLING, R. R. & T.H. CHUA. 2003. Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. **Science** **300**: 969–972.
- DE NARDIN, J. & A. M. ARAÚJO. 2011. A. M. Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Journal of Ethology**: DOI 10.1007/s10164-011-0272-2
- DE VRIES, P. J. & G. E. MARTINEZ. 1993. The morphology, natural history, and behavior of the early stages of *Morpho cypris* (Nymphalidae: Morphinae)—140 years after formal recognition of the butterfly. **Journal of the New York Entomological Society** **101**:515–30.
- DE VRIES, P. J. 1991. Mutualism between *This bee irenea* butterflies and ants end the role of ant ecology in the evolution of larval-ant associations. **Biological Journal of the Linnaean Society** **43**: 179–195.
- DE VRIES, P. J.; CABRAL, B. C. & C. M. PENZ. 2004. The early stages of *Apodemia paucipuncta* (Riodinidae): myrmecophily, a new caterpillar ant-organ and consequences for classification. **Milwaukee Public Museum Contributions in Biology and Geology** **102**:1–13.
- DE ZARZUELA, M. F. M.; CAMPOS-FARINHA, A. C.; RUSSOMANNO, O. M. R.; KRUPPA, P. C. & E. GONCALEZ. 2007. Evaluation of urban ants (Hymenoptera : formicidae) as vectors of microorganisms in residential and industrial environments: II. Fungi. **Sociobiology** **50**(2): 653–658.

- DEINERT, E.I. 2003. Mate location & competition for mates in a pupal mating butterfly, p 91–108. *In*: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (Eds.). **Butterflies: ecology and evolution taking flight**. University of Chicago Press, Chicago.
- DEL VAL, E. & R. DIRZO. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. **Interciência vol.29**, no.12, p.673–679.
- DETWILER, J. D. 1922. The ventral prothoracic gland of the red-humped apple caterpillar (*Schizura concinna* Smith and Abbot). **Canadian Entomologist** **54**:175–91.
- DUNLAP-PIANKA, H.; BOGGS, C. L.; & L. E. GILBERT. 1977. Ovarian dynamics in heliconiini butterflies: programmed senescence versus eternal youth. **Science** **197**:487–490.
- DUTRA, H. P.; FREITAS, A. V. L. & P.S. OLIVEIRA. 2006. Dual ant attraction in the neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. **Functional Ecology** **20**: 252–260.
- EDMUNDS, M. 1974. **Defense in animals. A survey of antipredator defenses**. Longman group, Harlow. UK.
- FANFANI, A. & M. V. DAZZINI. 1989. The jugular gland of *Inachis io* L. larva (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE). **Pubblicazioni dell'Istituto di entomologia dell'Università di Pavia** **38**:1–8.
- FERREIRA, J. T. B. & P. H. G. ZARBIN. 1998. Amor ao primeiro odor: A comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola** **2**(7): 3–6.
- FERRO, V. G. 1998. **Criação de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae) em condições seminaturais**. Unpublished Honors Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- FLOREN, A.; BIUN, A. & K. E. LINSÉNMAIR. 2002. Arboreal ants as key predators in tropical lowland rainforest trees. **Oecologia** **131**: 137–144.
- FOWLER, H. G.; BUENO, O. C.; SADATSUNE, T. & A. C. MONTELLI. 1993. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São-Paulo, Brazil. **Insect Science and its Application** **14**(3): 367–370.

- FREITAS, A. V. L. & P. S. OLIVEIRA. 1996. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behavior of a non-myrmecophilous butterfly. **Journal of Animal Ecology** **65**: 205–210.
- FUKUI, A. 2001. Indirect interactions mediated by leaf shelters in animal-plant communities. **Population Ecology** **43**: 31–40.
- FURTADO, E. & F. C. CAMPOS-NETO. 2004. *Caligopsis seleucida* (Hewitson) e seus estágios imaturos. (Lepidoptera, Nymphalidae, Brassolinae). **Revista Brasileira de Zoologia** **21** (3): 593–597.
- GENTRY, G.L. & L.A. DYER. 2002. On the conditional, nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. **Ecology** **83**: 3108–3119.
- GILBERT, L. E. 1972. Pollen feeding and reproductive biology in *Heliconius* butterflies. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **69**: 1403–1407.
- GILBERT, L. E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants, p. 210–240. *In*: L. E. GILBERT and P. H. RAVEN (Eds.). **Coevolution of animals and plants**. Austin, University of Texas. XIII+246p.
- GILBERT, L. E. 1976 Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed antiaphrodisiac? **Science** **193**(4251): 419–420.
- GILBERT, L. E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems, p. 403–427. *In*: P. W. PRICE; T. M. LEWINSOHN; G. W. FERNANDEZ and W. W. BENSON (Eds.). **Plant-animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. New York, John Wiley and Sons, 639 p.
- GROSS, P. 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. **Annual Review of Entomology** **38**: 251–273.
- HALL, J. P. W.; HARVEY, D. J. & D. H. JANZEN. 2004. Life History of *Calydna sturnula* with a Review of Larval and Pupal Balloon Setae in the Riodinidae (Lepidoptera). **Annals of the Entomological Society of America** **97**(2):310–321.

- HALLBERG, E. & G. POPPY. 2003. Exocrine glands: chemical communication and chemical defense, p. 361–75. *In*: N. P. Kristensen (Ed.). **Handbuch der Zoologie, 4(36): Lepidoptera, Moths and Butterflies, Part 2**. De Gruyter, Berlin.
- HOLZINGER, H. & R. HOLZINGER. 1994. **Heliconius and related genera**. Venette, Sciences Nat., 328p.
- KAMINSKI, L. A. 2008a. Immature Stages of *Caria plutargus* (Lepidoptera: Riodinidae), with Discussion on the Behavioral and Morphological Defensive Traits in Nonmyrmecophilous Riodinid Butterflies. **Annals of the Entomological Society of America** **101**(5): 906–914.
- KAMINSKI, L. A. 2008b. Polyphagy and Obligate Myrmecophily in the Butterfly *Hallonympha paucipuncta* (Lepidoptera: Riodinidae) in the Neotropical Cerrado Savanna. **Biotropica** **40**(3): 390–394.
- KAMINSKI, L. A.; SENDOYA, S. F.; FREITAS, A. V. & P. S. OLIVEIRA. 2009. Ecologia comportamental na interface formiga-planta-herbívoros: interações entre formigas e lepidópteros. **Oecologia Brasiliensis** **13**(1): 27–44.
- KAMINSKI, L. A.; TAVARES, M.; FERRO, V. G.; & G. R. P. MOREIRA. 2002. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Revista Brasileira de Zoologia** **19** (4): 977–993.
- KLEIN, A. L. & A. M. ARAUJO. 2010. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? **Journal of Ethology** **28**:p. 409–420.
- KLEMENSIEWICZ, S. 1883. Zur näheren Kenntniss der Hautdrüsen bei den Raupen und bei Malachius. **Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft** **32**(1882):459–74.
- LOPES, F. S. & P. DE MARCO JR. 2000. Comportamento territorial em insetos: aspectos conceituais e estudos de casos, p. 193–222. *In* MARTINS, R. P., LEWINSOHN, T. M. and BARBEITOS, M. S. (Eds.). **Ecologia e comportamento de insetos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VII. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil.

- MARTI, O. G. & C. E. ROGERS. 1988. Anatomy of the ventral eversible gland of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), larvae. **Annals of the Entomological Society of America** **81**:308–17.
- MEGA, N. O. & A. M. ARAÚJO. 2008. Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants?. **Journal of Natural History** vol. **42**(1–2):129–137.
- MILLER, J. S. 1991. Cladistics and classification of the Notodontidae (Lepidoptera: Noctuoidea) based on larval and adult morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History** no. 204, p. 1–230.
- MONTEIRO, R. F. 2000. Coloração críptica e padrão de uso de plantas hospedeiras em larvas de duas espécies mirmecófilas de *Rekoa* Kaye (Lepidoptera, Lycaenidae), p. 259–280. *In*: Martins, R. P., Lewinsohn, T. M., Barbeitos, M. S. (Eds.). **Ecologia e comportamento de insetos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VIII. PPGE UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil.
- MORAIS, H.C. 1994. Coordinated group ambush: a new predatory behavior in *Azteca* ants (Dolichoderinae). **Insectes Sociaux** **41**: 339–342.
- MOREIRA, D. D. O.; DE MORAIS, V.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; CAMPOS-FARINHA, A. E. D. & A. TONHASCA. 2005. Ants as carriers of antibiotic-resistant bacteria in hospitals. **Neotropical Entomology** **34**(6): 999–1006.
- MOREIRA, G. R. P.; FERRARI, A.; MONDIN, C. A. & A. C. CERVI. 2011. Panbiogeographical analysis of passion vines at their southern limit of distribution in the Neotropics. **Revista Brasileira de Biociências** **9**: 28–40.
- NAHRSTEDT, A. & R. H. DAVIS 1983. Occurrence, variation and biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology** **75B**(01): 65–73.
- NAKAMURA, M. 1998. The eversible cervical gland and the chemical component of its secretion in noctuid larvae. **Tyô to Ga** **49**(2):85–92.

- OLIVEIRA, P.S. & K. DEL-CLARO. 2005. Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemipteran systems, associated insect herbivores and a host plant, p. 414–438. *In*: D.F.R.P. Burslem, M.A. Pinard and S.E. Hartley (Eds.). **Biotic Interactions in the Tropics**. Cambridge University Press, Cambridge. 564p.
- OSBORN, F. & K. JAFFÉ. 1998. Chemical ecology of the defense of two nymphalid butterfly larvae against ants. **Journal of Chemical Ecology** 24:1173–86.
- OSBORN, F.; SÁNCHEZ, F. & K. JAFFÉ. 1999. Ultrastructure of the spines and neck gland of *Abanote hylonome* Doubleday, 1844 (Lepidoptera: Nymphalidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology** 28(4): 321–330.
- OSBORNE, L. S.; PENA, J. E. & D. H. OI. 1995. Predation by *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae) on twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) in Florida greenhouses. **Florida Entomologist** 78(4): 565–570.
- PALUCH, M.; CASAGRANDE, M. M. & O. H. H. MIELKE. 2001. Estágios imaturos de *Actinote carycina* Jordan (Lepidoptera, Nymphalidae, acraeinae). **Revista Brasileira de Zoologia** 18 (3): 883–896.
- PERCY, J. & J. A. MACDONALD. 1979. Cells of the thoracic defensive gland of the red-humped caterpillar, *Schizura concinna* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Notodontidae): ultrastructural observations. **Canadian Journal of Zoology** 57: 80–94.
- PETERSON, A. 1962. **Larvae of Insects: An Introduction to Nearctic Species. Part I: Lepidoptera and Plant Infesting Hymenoptera**. Ann Arbor, MI: Edwards Brothers.
- PORTUGAL, A. H. A. & J. R. TRIGO. 2005. Similarity of cuticular lipids between a caterpillar and its host plant: a way to make prey undetectable for predatory ants? **Journal of Chemical Ecology** 31: 2551–2561.
- POVEL, G. D. E. & M. M. L. BECKERS. 1982. The prothoracic “defensive” gland of *Yponomeuta*-larvae (Lepidoptera, Yponomeutidae). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C** 85(3):393–98.

- RAMOS, R. R. & A. V. L. FREITAS. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists society** **53**(1): 11–21.
- RICO-GRAY, V. & P. S. OLIVEIRA. 2007. **The ecology and evolution of ant-plant interactions**. University of Chicago Press, Chicago. 331p.
- ROESSINGH, P. 1990. Chemical marker from silk of *Yponomeuta cagnagellus*. **Journal of Chemical Ecology** **16**:2203–16.
- ROMANOWSKI, H. P., GUS, R. & A. M. ARAÚJO. 1985. Studies on the genetics and ecology of *H. erato* (Lepid.; Nymph.) III. Population size, preadult mortality, adult resources and polymorphism in natural populations. **Revista Brasileira de Biologia** **45**: 563–569.
- SALAZAR, B. A. & D. W. WHITMAN. 2001. Defensive tactics of caterpillars against predators and parasitoids, p. 161–207. *In*: T.N. Ananthakrishnan (Ed.). **Insects and plant defenses dynamics**. Science Publishers, Inc., Plymouth, 253p.
- SATO, H. & S. HIGASHI. 1987. Bionomics of *Phyllonorycter* (Lepidoptera, Gracillariidae) on *Quercus*. II. Effects of Ants. **Ecological Research** **2**: 53–60.
- SCHAFFER, C. 1889. Beiträge zur Histologie der Insekten. **Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Anatomie und Ontogenie der Tiere** **3**(1888–1889):611–52.
- SCHEURER, S. & G. LIEBIG. 1998. *Tapinoma melanocephalum* Fabr. (Formicidae, Dolichoderinae) in buildings - Observations on its biology and control. **Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz** **71**(8): 145–148.
- SCOBLE, M. J. 1995. **The Lepidoptera. Form, function and diversity**. The natural history museum in association with Oxford University Press. 404 pp.
- SEVERSON, R. F., ROGERS, C. E., MARTI O. G., GUELDER R. C. & R. F. ARRENDAL. 1991. Ventral eversible gland volatiles from larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Agricultural and Biological Chemistry** **55**:2527–30.

- SMILEY, J. T. 1985. *Heliconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. **Ecology** **66**: 845–849.
- SMILEY, J. T. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectarines: effects on caterpillar survival. **Ecology** **67**: 516–524.
- SOUZA, N. A.; VEIGA, A. F. S. L.; CASAGRANDE, M. M. & M. G. C. GONDIN JR. 2006. Morfologia externa de imaturos de *Caligo teucer* (Linnaeus) (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE). **Revista Brasileira de Zoologia** **23**(4): 1243–1250.
- SPENCER, K. C. 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction, p. 167–240. *In*: K. C. Spencer (Ed.). **Chemical Mediation of Coevolution**, Academic Press, New York, NY, USA.
- STEHR, F. W. 1987. Order Lepidoptera, p. 293–294. *In*: F. W. Stehr, (Ed.). **Immature Insects Vol. I**. Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa, USA.
- SWIHART, C. A. & S. L. SWIHART. 1970. Colour selection and learned feeding preferences in the butterfly *Heliconius charitonius* Linn. **Animal Behaviour** **18**: 60–64.
- TAMSITT, J. R. & I. FOX. 1966. *Tapinoma melanocephalum* attacks laboratory fleas in puerto rico - hymenoptera – Formicidae. **Proceedings of The Entomological Society of Washington** **68**(3): 268.
- TURNER, J. R. G. 1981. Adaptation and evolution in *Heliconius*: a defense of NeoDarwinism. **Annual Review of Ecology and Systematics** **12**:99–121.
- VEGLIANTE, F. & I. HASENFUSS. 2011. Morphology and diversity of exocrine glands in lepidopteran larvae. **Annual Review of Entomology** **57**:187–204. Review.
- WETTERER, J. K. 2009. Worldwide spread of the ghost ant, *Tapinoma melanocephalum* (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News** **12**: 23–33.
- WILLMOTT, K. R.; ELIAS, M. & A. SOURAKOV. 2011. Two Possible Caterpillar Mimicry Complexes in Neotropical Danaine Butterflies (Lepidoptera:

Nymphalidae). **Annals of the Entomological Society of America** **104**(6):1108–1118.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B. & W. S. LEAL. 1998. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova** **22**: 263–268.

CAPÍTULO II. ANÁLISE DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO
ADULTO DE *Heliconius erato phyllis* Fabricius, 1775 (LEPIDOPTERA:
NYMPHALIDAE: HELICONIINAE).



RESUMO

Capítulo II. Os heliconíneos produzem antiafrodisíaco em glândulas localizadas nas valvas dos machos e estes o transferem durante a cópula, para a glândula abdominal dorsal amarela ou alaranjada presente na fêmea. O objetivo geral deste estudo foi analisar a composição química dos voláteis, a morfologia externa das glândulas odoríficas abdominais do adulto de *H. erato phyllis*, e o comportamento associado à produção. A metodologia de análises químicas consistiu da extração por solvente e análise em cromatografia gasosa e em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e, a bioatividade intraespecífica dos compostos, foi observada através de bioensaios com exposição a extratos e análises de eletroantenografia. Os resultados obtidos revelam que o macho transfere todo o seu “*bouquet*” odorífico para a fêmea e, que possui provavelmente um composto bioativo para as fêmeas virgens dentre os cinco possíveis compostos bioativos observados. A análise da localização e morfologia externa mostrou que a glândula do macho, apresenta cerdas longas e translúcidas em orifício alongado, enquanto a glândula da fêmea apresenta pregas e projeções translúcidas na superfície dos lobos, responsáveis respectivamente pela transferência, por contato, do “*bouquet*” odorífico e, pela recepção e emissão dos voláteis juntamente com os bastões odoríficos.

ABSTRACT

Chapter II. The Heliconiinae antiaphrodisiac is produced by glands located in the valves of the male and transferred during copulation to the yellow or orange dorsal abdominal gland present in the female. The main goal of this study was to analyze the chemical composition of volatiles, the external morphology of the abdominal scent glands of the adult of *H. erato phyllis*, and the behavior associated with this production. The methodology of chemical analysis consisted of solvent extraction and analysis in gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry and, the intraspecific bioactivity of the compounds was observed in bioassays by exposure to extracts and electroantennography analysis. The results of chemical analysis revealed that the male transfers his whole scent bouquet to the female and that are likely to have a bioactive compound for virgin females among the five possible bioactive compounds observed. The analysis of location and external morphology showed that the male gland, presents long and translucent bristles in the elongated hole and, while the female gland presents folds and translucent projections on the surface of the lobes responsible respectively for the transfer of the scent bouquet by contact and for the reception and emission of the volatiles along with the stink clubs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adaptação defensiva – Adulto

Nos adultos, além do mimetismo batesiano, a advertência também se dá através de marcas odoríficas e coloração (aposematismo), sendo que esta última está relacionada com a adaptação defensiva conhecida como impalatabilidade e é encontrada em muitos imaturos e adultos de Nymphalidae, sinalizada através do mimetismo Mülleriano. Esta coloração de alerta de toxidade evita a predação por vertebrados e/ou invertebrados. Inclui-se entre as espécies impalatáveis as borboletas da tribo Troidini (Papilionidae), Pierinae (Pieridae), Eurytelinae, Melitaeinae, Danainae, Ithominae, Heliconiinae e Acraeinae (Nymphalidae) e mariposas Arctiidae (TRIGO 2000).

As glândulas exócrinas descritas para os machos adultos de heliconíneos da América do Sul, não especificamente com a função de defesa, constam de glândulas de forte odor associadas às escamas abdominais e às escamas das asas; estrutura denominada androcônia, um órgão de disseminação de feromônio sexual masculino, importante para a atração das fêmeas (DEVRIES 1987), sendo que em *Heliconius*, são numerosas ao longo das veias das asas posteriores (MÜLLER 1912). Bem como há aquelas localizadas nas valvas do macho (ELTRINGHAM 1925, 1926). Fêmeas apresentam um par de glândulas alaranjadas ou amareladas de forte odor característico entre o penúltimo e último segmentos abdominais, associadas a bastões odoríficos (MÜLLER 1912), considerados como glândulas auxiliares por Eltringham (1925, 1926). A função das glândulas exócrinas abdominais dos adultos está originalmente relacionada com a defesa, como sugerido por Müller (1912), bem como à produção de um antiafrodisíaco pelo macho, conforme proposto por Gilbert (1976).

1.2 Sucesso adaptativo

Considerado um dos grupos mais bem sucedidos de borboletas neotropicais as espécies do gênero *Heliconius* Kluk, 1780 (TURNER 1981) apresentam eventos vantajosos de acasalamento que determinam grande parte deste sucesso. É relatada a liberação de sinais químicos para identificação de pupas fêmeas originados no final do estágio de pupa do macho (GILBERT 1976), uma coevolução com a biologia reprodutiva de *Heliconius* considerando-se as vias biossintéticas dos compostos identificados (monoterpenos) (ESTRADA *et al.* 2009), a ocorrência de cópula logo após a emergência da fêmea (TURNER 1981, GILBERT 1976, DEINERT 2003, KLEIN & ARAÚJO 2010), a transferência de presente nupcial do macho para a fêmea durante a cópula (CARDOSO *et al.* 2009), e a transferência de antiafrodisíaco do macho para a fêmea após o acasalamento (EMSLEY 1963, GILBERT 1976, MÜLLER 1912, ELTRINGHAM 1925, 1926).

1.3 Antiafrodisíacos

São sinais químicos transferidos de machos para fêmeas durante o acasalamento que temporariamente reduzem a atratividade da fêmea para a corte posterior de machos. Descrito primeiramente no besouro *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (HAPP 1969), eles já foram encontrados em várias taxa, incluindo *Drosophila melanogaster* Meigen 1830, serpentes, e diversas espécies de abelhas, percevejos, gafanhotos, besouros, moscas e borboletas (GILBERT 1976, HAPP 1969, ROSS & CREWS 1977, KUKUK 1985, SCOTT 1986, ANDERSSON *et al.* 2000, ANDERSSON *et al.* 2003, ANDERSSON 2004, AYASSE *et al.* 2001, ZHANG & ALDRICH 2003, SEIDELMANN 2006, KYRIACOU 2007, SCHULZ *et al.* 2008). Em lepidópteros, pode tornar-se um instrumento de controle do macho sobre um novo acasalamento da fêmea (ANDERSSON *et al.* 2000, ANDERSSON *et al.* 2003, ANDERSSON 2004) e sua existência em borboletas foi sugerida pela primeira vez para *Heliconius erato* Linnaeus, 1758 (GILBERT 1976, MÜLLER 1912, ELTRINGHAM 1925, 1926). Em Pieridae, os machos de *Pieris napi* Linnaeus, 1758,

Pieris rapae Linnaeus, 1758 e *Pieris brassicae* Linnaeus, 1758, transferem espermatóforo com antiafrodisíaco à fêmea que inibe novos acasalamentos. Os voláteis são liberados quando a fêmea exhibe a atitude de “recusa ao macho” que consiste em abrir as asas horizontalmente e elevar o abdômen (ANDERSSON *et al.* 2000, ANDERSSON *et al.* 2003, ANDERSSON 2004, SCHULZ *et al.* 2008).

1.4 O abdome dos adultos

O abdome dos lepidópteros apresenta-se dividido em 10 segmentos sendo que os três últimos na fêmea e os dois últimos no macho estão modificados para formar a genitália (BILOTTA 1994). Todos os segmentos abdominais são formados por tergo, esterno e pleura, dependendo da posição que ocupam, dorsais, ventrais e laterais respectivamente. Da mesma forma que os demais segmentos, os segmentos IX e X, apresentam as três diferentes regiões, cada qual dando origem a uma estrutura genital diferente (BONFANTTI 2010).

Na genitália do macho o tergo A9 é grande e em forma de uma cobertura, conhecido como tegume, este se estende ventralmente através dos braços laterais do tergo A9, ou braços do tegume, que coincidem com os braços laterais do esterno A9, formando uma estrutura que quando observada em vista posterior tem o formato de um anel, sendo esta uma sinapomorfia para Amphiesmenoptera (Lepidoptera e Trichoptera) (KRISTENSEN *et al.* 2007). O esterno A9 se estende médio ventralmente para formar uma estrutura projetada anteriormente, o saco, além dos braços laterais comumente chamados como braços do saco. O tergo A10 forma o unco, um esclerito triangular com a base na maioria das vezes fusionado ao tegume. O gnato é a modificação do esterno A10, podendo ser ausente, com duas partes fundidas em uma estrutura única, ou separadas. O falo ou pênis, e as valvas, são derivados dos lobos primários fálicos da larva. As valvas, segundo Niculescu (1973), são formadas pelas membranas intersegmentares IX-X no adulto. Durante o desenvolvimento o edeago torna-se invaginado a partir da sua extremidade caudal para formar a vesica, que fusiona-se com a parte caudal do canal ejaculatório. A vesica é eversível, e pode apresentar espinhos esclerotizados, chamadas cornuti,

que ajudam a fornecer uma aderência dentro da bolsa copulatória da fêmea durante o acasalamento. O diafragma é uma membrana que fecha a extremidade do abdômen, e é perfurada pelo edeago. São distinguidas três regiões funcionais no diafragma: a fultura superior (dorsal), a fultura inferior (ventral), e o anellus (central), que se dobra em torno do edeago. Estas regiões não são claramente distintas, mas nem sempre estão presentes no caso da fultura superior e/ou inferior. A principal função das valvas é segurar a fêmea durante o acasalamento. Existe uma grande variedade na forma das valvas, de pequenas a grandes, e podem ser simples ou complexas (BONFANTTI 2010, SCOBLE 1995).

Simonsen (2006) descreve um grande bolso glandular que é encontrado nas valvas dos Heliconiinae da tribo Argynnini examinadas. Uma variação considerável do bolso glandular existe entre os taxa superiores. Na tribo Argynnini o bolso possivelmente tem um mecanismo de fecho eficaz, permitindo ao macho armazenar uma quantidade considerável de secreção glandular, que é transferida para a fêmea durante a cópula. Esta secreção teria uma função antiafrodisíaca, impedindo o acasalamento da fêmea com outros machos. Todos os machos examinados também possuem glândulas no anellus, a membrana terminal entre as valvas, sendo extremamente bem desenvolvidas em *Boloria* Moore, 1900.

Na morfologia externa da fêmea, a genitália está adaptada para as funções de oviposição e acasalamento. Modificações de segmentos A8-A10 formam o ovipositor e as suas apófises. As bordas anteriores dos segmentos A8 e A9 + A10 são geralmente estendidas em um par de apófises internas, embora elas não sejam universalmente presentes em Lepidoptera. As apófises funcionam como suporte, em particular para os longos ovidutos estreitos, e para a fixação do músculo. As apófises de tergo A8 são chamadas de apófises anteriores e as do tergo A9 ou A9 + A10 as apófises posteriores (SCOBLE 1995). Em *Actinote melanisans* Oberthür, 1917, a bolsa copulatória comunica-se com o exterior através do óstio da bursa (que se localiza no canal da bolsa em que surge o canal seminal) e este poro geralmente é cercado por escleritos chamados coletivamente de sterigma ou placa genital (PALUCH *et al.* 2008). Em *Danaus plexippus* Linnaeus, 1758 e *A. melanisans*, as papilas anais são lóbulos cerdosos levemente esclerotinizadas, cobertas por numerosos pelos em Morphinae (BILOTTA 1994), em ambos os lados da protuberância membranosa da área anal (PALUCH *et al.* 2008, EHRLICH 1958). Ao

separar-se as papilas anais verticalmente observa-se nesta área membranosa o ânus e o oviporo, este último representando a abertura externa da vagina, que permite a postura de ovos (BILOTTA 1994, PALUCH *et al.* 2008, EHRLICH 1958).

1.4.1 Produção e recepção de antiafrodisíaco – Heliconiinae

Os voláteis são liberados de glândulas localizadas nos últimos segmentos abdominais, de machos após período de maturação sexual, e de fêmeas acasaladas. A descrição da glândula odorífica abdominal do adulto é variável entre os autores, como se pode observar nas descrições a seguir. A produção dos voláteis se dá em glândulas presentes nas valvas, também denominadas cláspes (ELTRINGHAM 1925, 1926), do macho que prendem o abdome da fêmea durante a cópula (OCKENFELS *et al.* 1998, ROSS *et al.* 2001). Eltringham (1925) descreve um alongado orifício externo nas glândulas das valvas; e denominou-as de “*harpal glands*”, devido à forma de harpa. A recepção dos voláteis ocorre em um par de glândulas alaranjadas ou amareladas entre o penúltimo e último segmentos abdominais, associadas a bastões odoríficos, que passam a ter, após o acasalamento um forte odor (MÜLLER 1912); conjunto também nomeado de glândula amarela extrudada da fêmea, que expõe dois bastões odoríficos laterais durante a emissão dos voláteis (GILBERT 1976, ELTRINGHAM 1925, ROSS *et al.* 2001), consideradas como glândulas auxiliares por Eltringham (1925). Na fêmea de *Heliconius melpomene* Linnaeus, 1758, a glândula consta de uma grande glândula amarela que quando inflada expõe um par de estruturas em forma de bastão que provavelmente distribuem os materiais voláteis; no macho a glândula está localizada dentro dos dois cláspes que agarram o abdome da fêmea durante a cópula (SCHULZ *et al.* 2008). Para *Argynnis paphia* Linnaeus, 1758, a transferência de antiafrodisíaco se dá por contato entre a superfície externa da glândula existente nos cláspes ou valvas dos machos e a superfície externa do saco dorsal existente no sétimo tergito abdominal da fêmea, que é liberado através de abertura existente entre o sétimo e oitavo tergitos (OCKENFELS *et al.* 1998). Em *Agraulis vanillae* Linnaeus, 1758, as glândulas odoríficas abdominais são descritas como glândulas

das valvas anais do macho e glândula amarela extrudada no dorso da fêmea (ROSS *et al.* 2001).

1.4.2 Composição química do antiafrodisíaco

A composição química do antiafrodisíaco é variável em Heliconiinae. Em *A. paphia* o macho transfere α farneseno e 1-dodecil-acetato (OCKENFELS *et al.* 1998), em *H. melpomene*, o (E)- β -ocimeno é transferido às fêmeas (SCHULZ *et al.* 2008), e em *A. vanillae*, o volátil 6 -metil-5-hepten-2-ona é encontrado no macho e na fêmea após o acasalamento, onde sugere-se que evita a predação de aves (ROSS *et al.* 2001). Os compostos, (E)- β -ocimeno, isopentanoato de hexilo e salicilato de benzilo, são compostos conhecidos por provocar a rejeição das fêmeas durante a corte de machos em *H. melpomene*, *Heliconius cydno* Doubleday, 1847, e *Heliconius charithonia* Linnaeus, 1767, respectivamente (SCHULZ *et al.* 2008, ESTRADA 2009). Foram descritos como compostos das glândulas odoríficas abdominais de dez espécies do gênero *Heliconius*, uma mistura química que inclui ésteres (41%), lactonas (26%), e terpenos (15%), sendo o restante álcoois, cetonas, e compostos aromáticos (ESTRADA *et al.* 2011), divididos em grandes compostos voláteis e uma complexa matriz de ésteres (SCHULZ *et al.* 2008, OCKENFELS *et al.* 1998, ROSS *et al.* 2001, ESTRADA 2009). Macrolídeos foram os compostos principais encontrados nos voláteis de *H. cydno* e *H. pachinus* Salvin, 1871 (SCHULZ *et al.* 2007), para esta última uma lactona ((R)-(Z,E)-9,11-octadecadieno-13-olida) foi encontrada em machos e fêmeas maduros, mas não em jovens adultos e pupas (MIYAKADO *et al.* 1989). Os voláteis, em *H. melpomene*, teriam por função repelir os machos enquanto que a matriz presume-se, regularia a evaporação dos voláteis durante a exposição da glândula da fêmea (SCHULZ *et al.* 2007, SCHULZ *et al.* 2008). O (E)- β -ocimeno, antiafrodisíaco de *H. melpomene* está presente, embora em quantidades mais baixas, na maioria das outras borboletas *Heliconius* estudadas até agora (SCHULZ *et al.* 2008, ESTRADA 2009, ESTRADA *et al.* 2011).

1.4.3 O antiafrodisíaco – Função

O antiafrodisíaco transferido para as fêmeas teria por objetivo a redução da competição por esperma (macho), o aumento da longevidade da fêmea, diminuição do risco de predação e a diminuição do tempo de busca por fêmeas virgens, por outros machos (SCHULZ *et al.* 2008, THORNHILL & ALCOCK 1983, COOK *et al.* 1994, CLUTTON-BLOCK & LANGLEY 1997, BATEMAN *et al.* 2006), dando à fêmea uma economia de tempo e energia para a postura (ESTRADA *et al.* 2011). Permitindo aos adultos além da comunicação sexual, a emissão de um alerta de toxicidade; gerando proteção e defesa (MÜLLER 1912, ROSS *et al.* 2001), propagando sua toxicidade para os predadores, reforçando a colorações de alerta (ELTRINGHAM 1925). Em *H. cydno* e *H. pachinus* os voláteis das glândulas odoríferas abdominais foram também relacionadas com uma possível função de proteger os ovos de doenças fúngicas (SCHULZ *et al.* 2007).

Os odores liberados pelas glândulas abdominais também poderiam fornecer sinais adicionais para reconhecimento de espécies (ESTRADA *et al.* 2011), já que as borboletas *Heliconius* existem como comunidades de até nove espécies coexistentes, muitos dos quais são conhecidos por hibridar, e machos e fêmeas compartilham um interesse em reduzir novos acasalamentos heteroespecíficos (GILBERT 2003, MALLET *et al.* 2007, KRONFORST 2008). Klein e Araújo (2010) relatam que em *H. erato phyllis* o efeito antiafrodisíaco do odor transferido para as fêmeas dura aproximadamente dois dias, em seus estudos sobre o comportamento de corte.

Associados à emissão dos voláteis antiafrodisíacos em *P. brassicae* e *P. rapae* estão os parasitoides *Trichogramma brassicae* Bezdenko, 1968 e *Trichogramma evanescens* Westwood, 1833, que utilizam o antiafrodisíaco liberado para identificar fêmeas acasaladas. Estas fêmeas servem de transporte forético para encontrar ovos recém-colocados e parasitá-los; fenômeno conhecido como espionagem química (HUIGENS *et al.* 2010). Em borboletas da família Pieridae, a substância antiafrodisíaca (GILBERT 1976) é drenada pelas fêmeas que voltam ao acasalamento em poucos dias (KLEIN & ARAÚJO 2010, ANDERSSON *et al.* 2000, ANDERSSON *et al.* 2003, ANDERSSON 2004).

A função potencial de defesa que estes compostos dos machos fornecem às fêmeas pode ter determinado a evolução do órgão de armazenamento e de exibição em fêmeas Heliconiinae. Os odores, juntamente com coloração, sendo usados para a sinalização de predadores, poderiam determinar uma convergência do sinal químico entre as espécies miméticas (porque sinalizações multimodais podem ser mais eficazes na educação predadores locais) (MOORE & BROWN 1989, MOORE *et al.* 1990, ROWE & GUILFORD 1999, JETZ *et al.* 2001, SIDDALL & MARPLES 2008), embora até o momento não tenha sido encontrada uma similaridade na composição química de glândulas abdominais entre as espécies miméticas em *Heliconius* (ESTRADA 2009).

1.5 A evolução do antifrodisiáco conduzida pela seleção sexual

ESTRADA *et al.* (2011) demonstraram a transferência de antiafrodisíaco em espécies do gênero *Heliconius* e as análises dos seus compostos demonstram serem em parte semelhantes. Analisou-se a composição química das glândulas abdominais de dez espécies (*H. cydno*, *H. pachinus*, *Heliconius numata* Cramer, 1780, *H. charithonia* Linnaeus, 1767, *Heliconius hewitsoni* Hewitson, 1875, *Heliconius hecale* Fabricius, 1776, *Heliconius ismenius* Latreille, [1817], *H. erato*, *Heliconius sapho* Drury, 1782 e *Heliconius sara* Fabricius, 1793), que combinados com dados mitocondriais e nucleares resultou em um mapeamento da sua filogenia. Alguma variação intraespecífica em tal composição, particularmente em compostos menores, ocorreu entre machos. O conteúdo de glândulas abdominais a partir de machos de *Heliconius* variou consideravelmente entre espécies, tanto na composição como no número de compostos. Sendo que divergiu mais rápido entre as espécies com maiores taxas de novo acasalamento de fêmeas (clado de acasalamento não pupal) do que entre aqueles em que as fêmeas apresentam muito menos frequência de novo acasalamento (clado de acasalamento pupal). Estes dados obtidos apoiam a ideia de que a evolução dos feromônios antiafrodisíacos em borboletas é em parte impulsionada pela seleção intrasexual. Pois há evidências convincentes teóricas e empíricas que a intensidade do conflito entre o emissor

(macho acasalado) e o receptor (futuro macho a acasalar) influencia a evolução de sinais complexos (ARAK & ENQUIST 1995).

1.6 As glândulas Odoríficas abdominais e o comportamento de corte

Estudos anteriores, e atuais realizados por Estrada (2009) sugerem que, inicialmente ocorre uma atração dos adultos através da coloração e que após, machos coespecíficos reconhecem as fêmeas por sinais químicos e por aproximação (ARAK & ENQUIST 1995, BOPPRÉ 1984, TAKANASHI *et al.* 2001, ESTRADA & JIGGINS 2008). Neste trabalho ficou evidente que para borboletas *Heliconius* estes sinais de reconhecimento não são liberados por glândulas odoríferas abdominais. As glândulas abdominais de fêmeas virgens de todos *Heliconius* estudados até a conclusão do trabalho (n= 11) tem composições químicas quase idênticas e assim não são susceptíveis de fornecer informações específicas para machos coespecíficos. Nos comportamentos de corte de heteroespecíficos observados verificou-se que o reconhecimento intraespecífico, para o acasalamento, aparentemente acontece sem liberação de feromônio antiafrodisíaco. Machos de Lepidoptera, também produzem sinais químicos em órgãos androconiais localizados em suas asas, e esses sinais são muitas vezes os estímulos necessários para a aceitação do macho pela fêmea, pois eles funcionam no reconhecimento de espécies e na avaliação da fêmea de um macho de qualidade (ESTRADA 2009, BOPPRÉ 1984, SCHULZ *et al.* 1993, ANDERSSON *et al.* 2007, COSTANZO & MONTEIRO 2007).

Klein e Araújo (2010) descrevem o comportamento apresentado pelos adultos de *H. erato phyllis* antes de chegarem à cópula; que ocorre em condições seminaturais, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, das 10h às 15h, com temperatura acima de 20°C, sem chuva ou vento forte. O macho apresenta a seguinte sequência de eventos: (1) inspeção em voo, (2) aproxima-se da fêmea e direciona o corpo para ela; (3) coloca as pernas sobre as asas anteriores da fêmea; (4) bate as asas abertas pausada e sincronicamente ao lado da fêmea; (5) expondo

ou não a androcônia; (6) dobra o abdome em direção à fêmea; (7) tateia com a espirotromba várias regiões do corpo da fêmea, e (8) segue a fêmea. Na fêmea foram observados os seguintes passos no comportamento de corte: (1) pousada, separa um pouco asas posteriores das anteriores; (2) vibra as asas; (3) expõe a glândula odorífica abdominal; (4) contrai as asas (fechadas), (5) realiza rotação sem deslocamento, mudando a posição em direção ao macho; (6) afasta-se, apresentando voos de curta duração, e (7) pousada, abre e separa as asas, expondo as margens dorsais das asas anteriores e posteriores.

2 OBJETIVOS

2.1 O objetivo geral

Analisar a composição química dos voláteis, a morfologia externa das glândulas odoríficas abdominais do adulto de *H. erato phyllis*, e o comportamento associado à produção.

2.2 Os objetivos específicos

- Extrair as valvas do macho e, a glândula odorífica abdominal da fêmea, acasalados e virgens, através da dissecação do abdome;
- Extrair os compostos das glândulas;
- Detectar a composição química dos voláteis;
- Estabelecer o tempo de maturação do macho através da comparação de cromatogramas;
- Quantificar os compostos dos extratos das glândulas odoríficas abdominais do macho, e fêmea acasalada;
- Testar a atividade biológica intraespecífica dos componentes presentes nos extratos, por bioensaios e eletroantenografia acoplada à cromatografia gasosa (CG-EAD);
- Caracterizar a morfologia externa e localização das glândulas odoríficas abdominais dos adultos através de análises de estereomicroscopia acoplada à câmara clara, fotografias em estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 METODOLOGIA

No insetário citado no capítulo I, após a coleta e adaptação de fêmeas para a postura de ovos, obtenção das larvas, e de adultos virgens, iniciaram-se os procedimentos para realização dos cruzamentos, dissecação das glândulas odoríferas abdominais; preparação dos extratos; bioensaios comportamentais, as análises químicas, eletroantenográficas e morfológicas.

Em área de reprodução, dentro do insetário, foram realizados os cruzamentos. Na extração por solvente, as unidades glandulares de adultos acasalados e virgens são colocadas em recipiente de vidro com hexano por um período de 2h. Testou-se a atividade biológica dos extratos de machos acasalados e fêmeas virgens com bioensaios comportamentais e eletroantenografia.

Os extratos resultantes da extração por solvente são analisados em CG, para avaliar-se a existência de transferência de antiafrodisíaco do macho para a fêmea, após o acasalamento, de feromônios sexuais e de alarme em adultos virgens e acasalados, e a concentração dos mesmos; e no CG-EM, para avaliar-se a composição dos compostos existentes.

Nas análises da morfologia externa e localização, o abdome de fêmeas e a genitália de machos foram descritos com base na estereomicroscopia, acoplada ou não à câmara clara e microscopia eletrônica de varredura. A metodologia aqui relatada encontra-se resumida na (FIGURA 21).

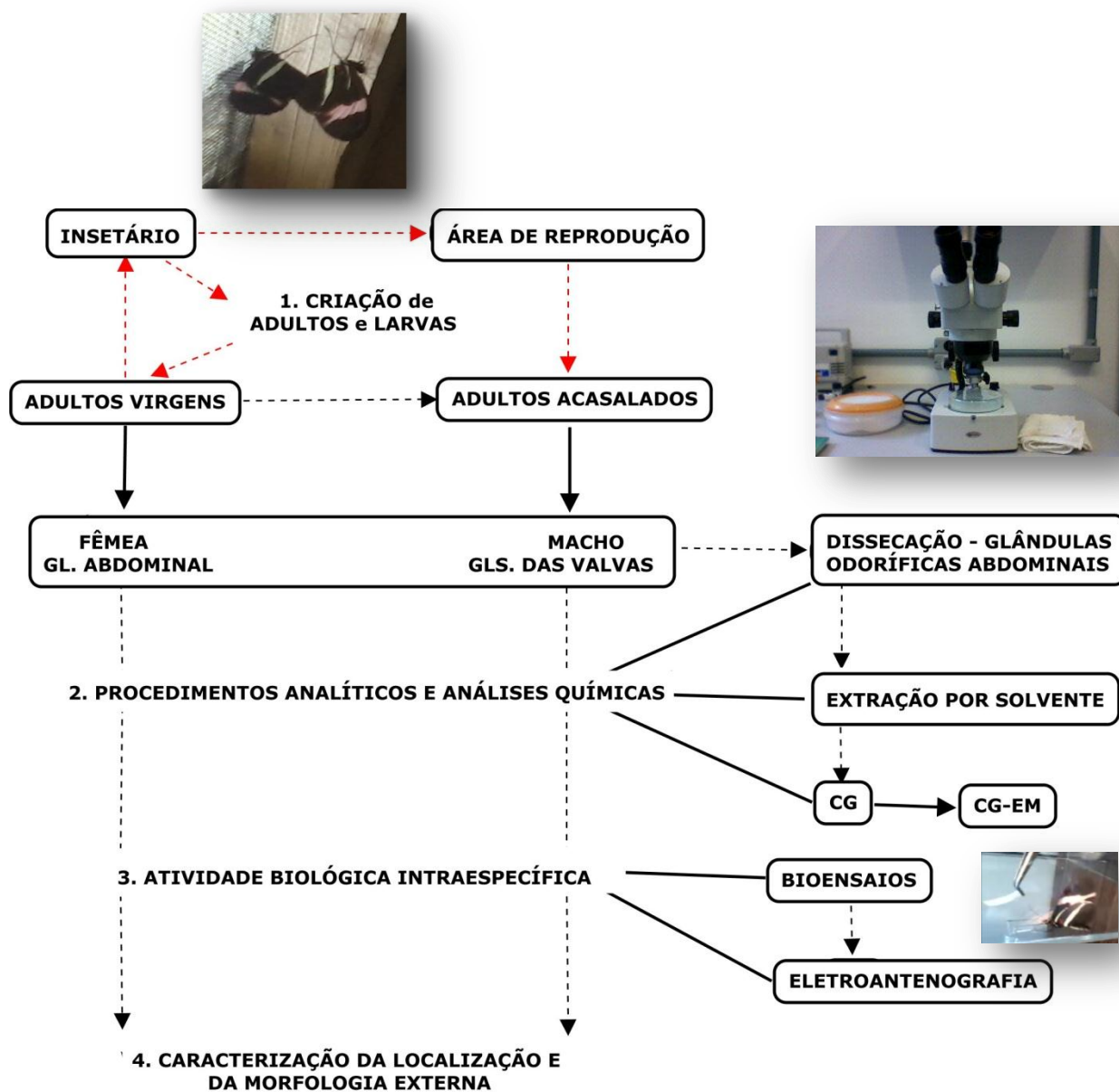


FIGURA 21. Resumo esquemático da metodologia de análise das glândulas odoríferas abdominais dos adultos de *H. erato phyllis*.
FONTE: O autor (2011).

3.1 Criação – manejo de adultos

Período: Período: Abril/2011 à Março/2012

Objetivo: obter exemplares de adultos virgens e acasalados de *H. erato phyllis* para os experimentos analíticos, análises químicas, de atividade biológica intraespecífica e da morfologia externa.

O insetário citado no capítulo I foi utilizado como ambiente de condições seminaturais para a manutenção dos adultos e oviposição, foram adotados os passos descritos de manejo de imaturos e adultos. No interior do insetário foi construída uma área de reprodução (FIGURA 22); com 2 m de altura, 1 m de largura e 1 m de comprimento, com suporte em madeira e revestido por tela sombrite, que permite a passagem de 30% da luz solar direta, para a realização dos acasalamentos; no seu interior foram colocados vasos com *P. edulis*, *P. actinia*, *I. walleriana*, *L. camara* e recipientes para a dieta artificial, de acordo com Borges *et al* (2010).



FIGURA 22. Área de reprodução construída no interior do insetário.
FONTE: O autor (2012).

Os adultos foram capturados na área de mata nativa do CP da UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil. Foram marcados na asa anterior direita, com caneta atóxica, sendo registrado o número do espécime, o sexo e a identificação do local de origem.

Ovos, larvas e os primeiros adultos emergidos para experimentos, foram mantidos em condições seminaturais em sala de criação no CP, UFPR.

a) Adultos virgens

Os adultos emergidos foram utilizados para as análises químicas iniciais e bioensaios (de Abril à Julho/2011). As glândulas odoríficas abdominais dos adultos virgens foram dissecadas com um, dois, três e quatro dias após a emergência e mantidas em hexano.

Os adultos virgens foram treinados individualmente, após 24h da emergência, para a utilização de recipiente plástico com a dieta artificial, que simula uma flor (FIGURA 23A). O recipiente foi adaptado ao suporte do frasco envolvido por tecido poroso de onde os mesmos eram retirados para os experimentos (FIGURA 23B).

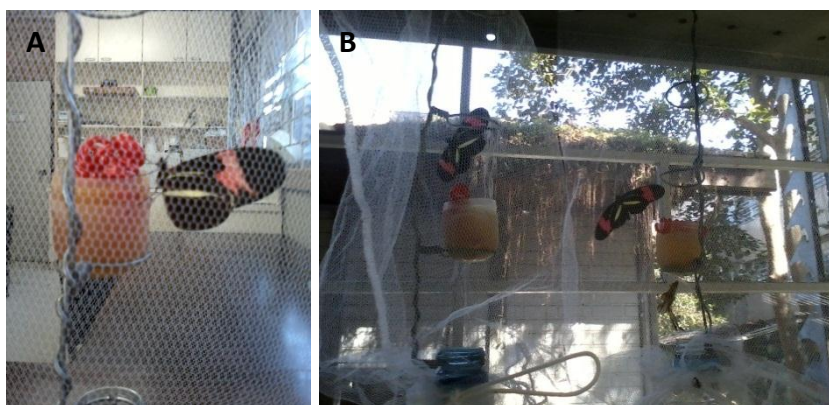


FIGURA 23. A, alimentação artificial de adultos na sala de criação. B, adultos de *H. erato phyllis* mantidos na sala de criação.

FONTE: O autor (2012).

b) Os acasalamentos

Obedeceu-se as necessidades da espécie para o comportamento de corte descrito em Klein e Araújo (2010). Machos capturados na mata nativa do CP da UFPR foram colocados individualmente na área de reprodução, que em média continha cinco fêmeas, possibilitando-se os acasalamentos (FIGURA 24).



FIGURA 24. Cópula de adultos de *H. erato phyllis* na área de reprodução do insetário.
FONTE: O autor (2012).

Imediatamente após o cruzamento suas glândulas odoríficas abdominais eram dissecadas e mantidas em hexano.

3.2 Procedimentos analíticos e análises Químicas

3.2.1 Extração por solvente

3.2.1.1 Dissecação

Objetivo (s): dissecar as glândulas odoríficas abdominais de adultos virgens e acasalados para preparação dos extratos.

As glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea, virgens e acasalados foram dissecadas em estereomicroscópio Quimis®.

As glândulas das valvas do macho foram obtidas a partir da secção das valvas, que foram mantidas em recipiente de vidro de 2 ml, com hexano, a uma concentração de 1 unidade em 50µL de hexano, durante 2h. A glândula odorífica abdominal dorsal da fêmea foi dissecada, contornando-se a sua extensão, de maneira que os bastões odoríficos fossem preservados e as papilas anais e placa genital, eliminadas. A glândula odorífica abdominal da fêmea acasalada foi colocada em recipiente de vidro com hexano, a uma concentração de 1 unidade em 50µL de hexano, durante 2h, e da fêmea virgem nas concentrações de 1 unidade em 10µL de hexano e de 1 unidade em 50µL de hexano. Os extratos obtidos e concentrações foram analisados em CG e CG-EM.

3.2.2 Métodos de análises dos extratos

3.2.2.1 Cromatografia gasosa (CG)

Objetivo: verificar a existência de voláteis e a concentração dos compostos nos extratos das glândulas odoríficas abdominais de adultos virgens e acasalados, estabelecer o tempo de maturação do macho através da comparação de cromatogramas, e quantificar os compostos dos extratos das glândulas odoríficas abdominais do macho e fêmea acasalada.

Os compostos foram analisados pelo cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu QP-2010 Plus, equipado com uma coluna capilar RTX-5 (30 milímetros × 0,25 mm × 0,25 milímetros) (Restek, Bellefonte, Pensilvania, EUA), com detector de ionização em chama (FID). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, mantida por cinco minutos. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7°C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 10 minutos. O padrão interno utilizado foi o tetradecano na concentração de 100ppm a 5µL/extrato.

A análise estatística das quantificações dos compostos possivelmente bioativos do macho (amostras com $n=4$), e a comparação das médias das quantificações dos compostos possivelmente bioativos no macho e fêmea logo após o acasalamento (amostras com $n=2$), foram realizadas no programa R, R Development Core Team (2011).

Os gráficos e cálculo dos desvios-padrão foram realizados no programa Excel®. Para a comparação entre os dados quantitativos obtidos no estabelecimento do tempo de maturação do macho, os dados foram elevados à potência 0,5 e após esta transformação, foi utilizado o teste Anova; as médias dos compostos possivelmente bioativos no macho e fêmea logo após o acasalamento, não foram analisados estatisticamente.

3.2.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Objetivo: verificar a composição química dos extratos das glândulas odoríferas abdominais.

Os compostos foram analisados pelo cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP-2010 Plus, equipado com uma coluna capilar RTX-5 (30 milímetros \times 0,25 mm \times 0,25 milímetros) (Restek, Bellefonte, Pensilvania, EUA), com detector de ionização em chama (FID). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, mantida por cinco minutos. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C/min até alcançar 250 °C, mantendo-se nesse valor por 10 minutos.

3.3 Atividade biológica intraespecífica

3.3.1 Bioensaios

Objetivo: avaliar a contribuição do extrato das glândulas odoríficas abdominais de fêmeas virgens e machos acasalados de *H. erato phyllis*, como possíveis detentores de feromônios sexuais, com base em comportamentos observados.

Machos e fêmeas virgens, após cinco dias de maturação, alimentados com dieta artificial e mantidos na sala de criação, foram colocados individualmente e aleatoriamente em caixa acrílica (30 cm x 30 cm), onde foram expostos a papel filtro (1 cm x 2 cm) no qual foram aplicados 10µL do extrato na concentração de 1 unidade, da glândula do sexo oposto, em 10µL de hexano, com 30s de evaporação, com auxílio de uma pinça. Os experimentos foram filmados em câmera filmadora JVC® GZ-HM320SUB.

Os comportamentos foram analisados com base em Klein e Araújo (2010). Os comportamentos padronizados para identificar a bioatividade dos extratos para machos (positivos para a corte) podem ser visualizados no (QUADRO 1):

Comportamentos de corte do macho de <i>H. erato phyllis</i>:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Inspeção em voo; 2. Aproxima-se da fêmea e direciona o corpo para ela; 3. Coloca as pernas sobre as asas anteriores da fêmea; 4. Bate as asas abertas pausada e sincronicamente ao lado da fêmea; 5. Exposição da androcônia (pode não correr); 6. Dobra o abdome em direção à fêmea; 7. Tateia, com a espirotromba, várias regiões do corpo da fêmea; 8. Segue a fêmea.

QUADRO 1. COMPORTAMENTOS PADRONIZADOS PARA IDENTIFICAR A BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS PARA MACHOS de *H. erato phyllis*.
FONTE: Klein e Araújo (2010).

Considerou-se como comportamentos padronizados para identificar a bioatividade dos extratos para fêmeas (positivos para a corte):

Comportamentos de corte da fêmea de <i>H. erato phyllis</i>:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pousada, separa um pouco asas posteriores das anteriores; 2. Vibra as asas; 3. Expõe a glândula odorífica abdominal; 4. Contração das asas fechadas; 5. Rotação sem deslocamento, mudando a posição em direção ao macho; 6. Afastamento, voos de curta duração; 7. Pousada, abre e separa as asas, expondo as margens dorsais das asas anteriores e posteriores.

QUADRO 2. COMPORTAMENTOS PADRONIZADOS PARA IDENTIFICAR A BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS PARA FÊMEAS de *H. erato phyllis*.
 FONTE: Klein e Araújo (2010).

Foi utilizado o programa R, R Development Core Team (2011), para análise estatística dos dados (teste qui-quadrado).

3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à detector de eletroantenograma (CG-EAD)

Objetivo: avaliar o extrato das glândulas odoríficas abdominais de fêmeas virgens e machos acasalados de *H. erato phyllis*, como possíveis detentores de feromônios sexuais, com base em eletroantenografia.

Extratos de glândulas de fêmeas virgens e machos acasalados, na concentração de 1 unidade em 50µL de hexano foram analisados por um sistema de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (CG-EAD). Foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-2010 acoplado a um sistema de detecção eletroantenográfica Syntech (Hilversum, Holanda) (FIGURA 25A). Uma

coluna RTX®-5 (30m X 0,25mm d.i. X 0,25µm de espessura de filme; Restek Chromatography Products, EUA) foi utilizada. Foram injetadas alíquotas de 1µL em modo splitless com a temperatura do injetor a 250°C, com a temperatura do forno mantida a 40°C por 5min, aumentada para 270°C em uma velocidade de 10°C.min⁻¹, sendo mantida nesta temperatura por 10 min. O gás Hélio foi empregado como gás de arraste, com um fluxo de 1 ml.min⁻¹. O fluxo oriundo da coluna foi dividido em uma razão 1:1, com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID), (temperatura de 270°C), e a outra parte indo para a linha de transferência aquecida e com uma corrente de ar umidificado (300 ml.min⁻¹) que ia diretamente para a antena dos insetos. Dois eletrodos de aço inox, com gel condutor (Signa gel, Parker Labs., EUA) foram utilizados para fixação da antena (FIGURA 25B). As informações geradas foram processadas utilizando-se o programa Syntech CG-EAD32 (versão 4.6).

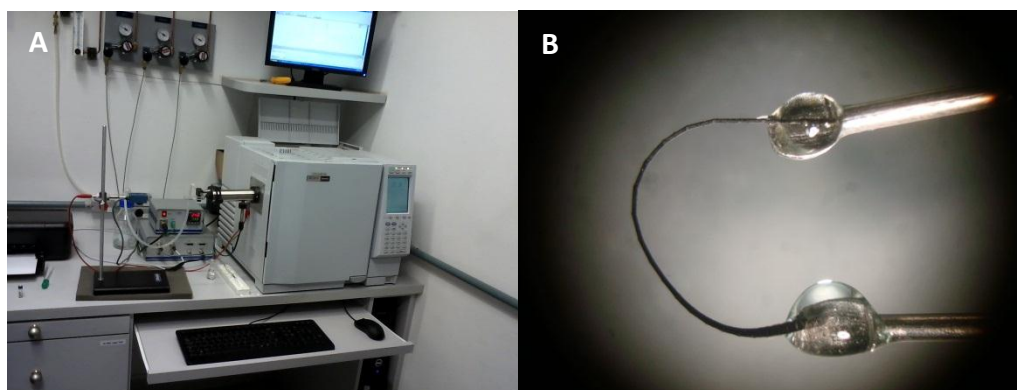


FIGURA 25. A, CG acoplado a detector eletroantenográfico (CG-EAD). B, antena de adulto de *H. erato phyllis* fixada com gel condutor a dois eletrodos de aço inox do sistema de cromatografia gasosa acoplada à detector eletroantenográfico (CG-EAD).
FONTE: O autor (2011).

3.4 Localização e morfologia externa

Objetivo: caracterizar a localização e a morfologia externa das glândulas odoríferas abdominais em adultos através de análises de estereomicroscopia

acoplada à câmara clara, estereomicroscopia acoplada à câmara fotográfica, e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A localização das glândulas odoríficas abdominais nos adultos de *H. erato phyllis* foi analisada em estereomicroscópio Zeiss® STEMI SV6 acoplado à câmara clara (FIGURA 26A). Abdômes de macho e fêmea foram imersos em uma solução de KOH 10% (hidróxido de potássio) e fervidos em banho-maria durante aproximadamente 4-5 minutos. Uma vez fervidas, as peças foram limpas com auxílio de um pincel. Posteriormente ocorreu a dissecação das estruturas para confecção das ilustrações (FIGURA 26B). Para a realização das ilustrações as peças foram fixadas, com micro alfinetes entomológicos em placa de parafina e água; os desenhos foram feitos à lápis em papel ou papel vegetal; copiados em nanquim (caneta à nanquim 0,1 para quitina, 0,05 para tecidos moles, sombreados e dobras) com fundo iluminado para papel vegetal. Os desenhos finais foram escaneados (alta resolução – 1200 dpi), com a extensão tiff.

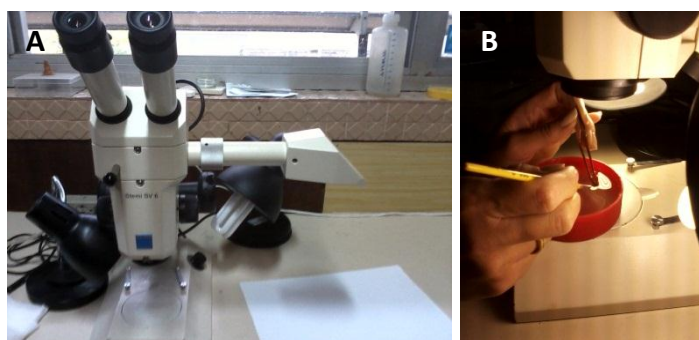


FIGURA 26. A, estereomicroscópio Zeiss® STEMI SV6 acoplado à câmara clara. B, análise em estereomicroscópio.
FONTE: O autor (2011).

A morfologia externa das glândulas odoríficas abdominais dos adultos de *H. erato phyllis* foi analisada em estereomicroscópio Leica® Mz16, acoplado à câmara Leica® DFC500, com o software de fotografias, Leica® IM50-5, e de montagem, Auto-Montagem-Pro® 5.03 Syncrosopy, e em microscópio eletrônico de varredura Jeol® JSM 6360LV (FIGURA 27A). As fotografias obtidas de estereomicroscópio foram feitas a partir de peças dissecadas, e resultantes da técnica de estereomicroscopia acoplada à câmara clara, submersas em glicerina. Na

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o preparo de amostras, também é conhecido como técnica de ponto crítico e consiste em: (1) Dissecar as amostras em tamanho pequeno, pois quanto menor o tamanho, mais amostras podem ser fixadas sobre o suporte, e acondicioná-las em álcool 70%. (2) Desidratação com banhos de álcoois, com concentrações progressivamente mais altas, chegando ao álcool absoluto. (3) As amostras são envoltas por um papel para que não se percam durante o processo de secagem no aparelho CPD 030 Baltec (FIGURA 27B), e permanece neste por cerca de 1 hora. (4) Depois de secas, as amostras serão fixadas no suporte para microscopia e aderidas a estes por uma fita de cobre. (5) Metalização (FIGURA 28A) dos suportes com as amostras: com um banho de ouro (FIGURA 28B). (6) Microscopia.



FIGURA 27. A, microscópio eletrônico de varredura Jeol® JSM 6360LV. B, aparelho CPD 030 Baltec. FONTE: O autor (2012).

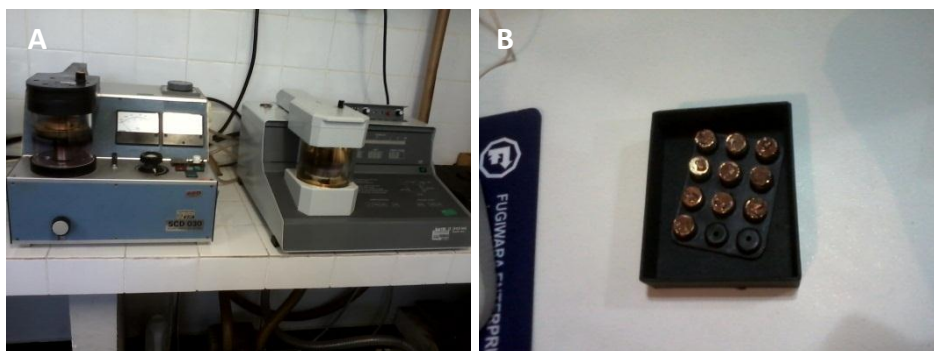


FIGURA 28. A, metalizadores. B, peças metalizadas. FONTE: O autor (2012).

4 RESULTADOS

4.1 Criação – manejo de adultos

a) Período: Período: Abril/2011 à Julho/2011

Foram conservados oito adultos na sala de criação para os bioensaios comportamentais e análises químicas iniciais.

Os demais adultos emergidos (de Fevereiro à Março de 2012) foram separados, as fêmeas foram mantidas na área de reprodução para os cruzamentos, e os machos na área restante do insetário. Os cruzamentos tiveram em média 1h de duração.

b) Período: Dezembro/2011 à Abril/2012

De Fevereiro a Março de 2012 foram mantidas em média duas fêmeas no insetário. No mês de Fevereiro, ocorreram posturas com maior número de ovos, que correspondeu às maiores temperaturas observadas. Em média emergiram aproximadamente vinte e sete adultos, por mês no período (GRÁFICO 2). As atividades insetário foram encerradas em Março de 2012.

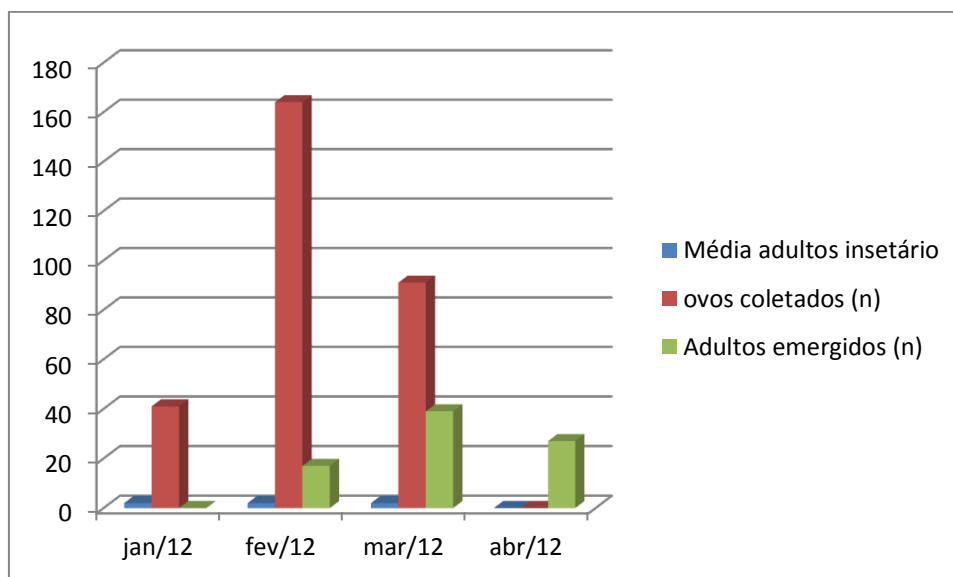


GRÁFICO 2. Dados quantitativos de ovos coletados, adultos emergidos e da média de adultos no insetário durante o período de criação (2012).
 FONTE: O autor (2012).

4.2 Extração por solvente

4.2.1 Dissecação

Foram dissecadas setenta e duas glândulas odoríficas abdominais dos adultos, para as análises químicas, de atividade biológica intraespecífica, de localização e da morfologia externa. Foram dissecadas as duas valvas do macho (FIGURA 29) e glândula odorífica abdominal da fêmea (FIGURA 30), para cada extrato.



FIGURA 29. Vista posterior do abdome do macho; (asteriscos), glândulas odoríficas abdominais. Aum.= 40x. Barra= 1 mm.
FONTE: O autor (2012).

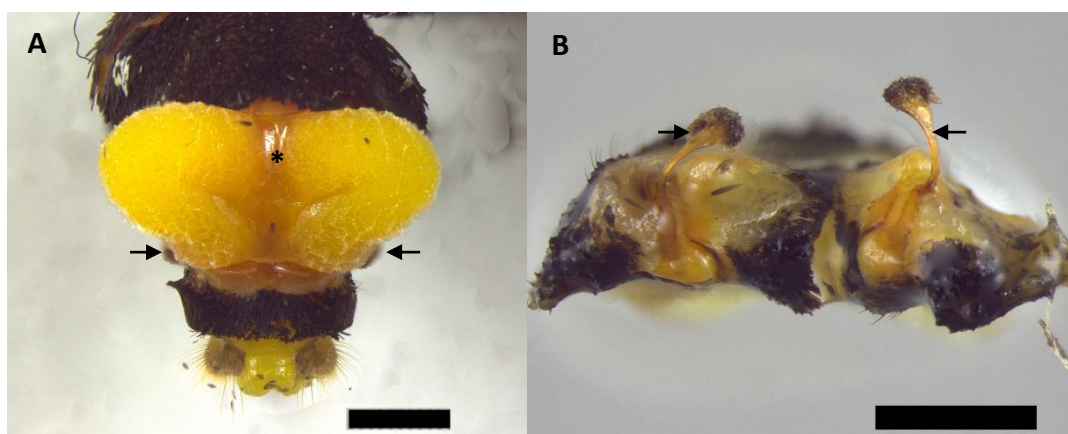


FIGURA 30. A, vista posterior e dorsal do abdome da fêmea; (asterisco), glândula odorífica abdominal extrudada de *H. erato phyllis*; (setas), bastões odoríficos. Aum.= 25x. B, (setas), detalhe dos bastões odoríficos. Aum.= 40x. Barras= 1 mm.
FONTE: O autor (2012).

4.2.2 Análises químicas

Foram realizadas oito análises CG, quinze análises CG-EM, dos extratos das glândulas odoríficas abdominais da fêmea virgem (FIGURA 31), em concentração de 1 unidade em 50 μ L de hexano, evidenciando-se que possivelmente

não produzem feromônios sexuais e compostos de alarme e defesa.

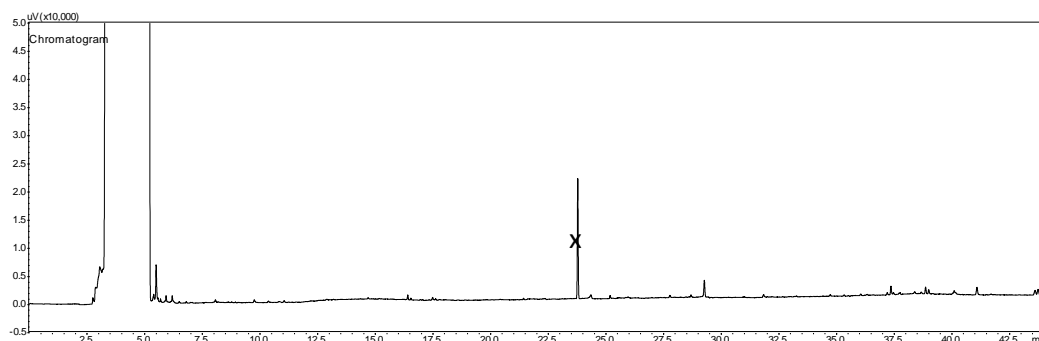


FIGURA 31. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea virgem (concentração de 1 a 50 μ L/glândula); (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).
FONTE: O autor (2012).

Foram realizadas oito análises CG, cinco análises CG-EM, dos extratos das glândulas odoríficas abdominais da fêmea acasalada (FIGURA 32), em concentrações de 1 unidade em 50 μ L de hexano, evidenciando-se que apresenta os mesmos compostos apresentados pelo macho maduro.

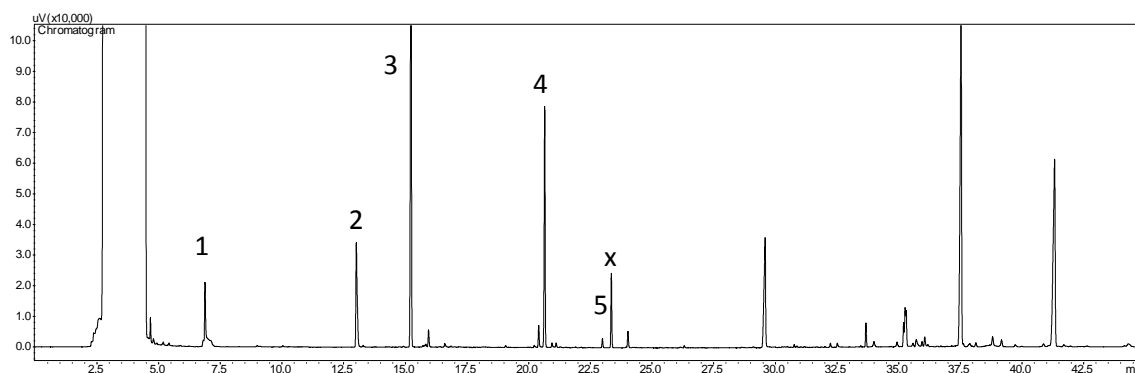


FIGURA 32. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea acasalada; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).
FONTE: O autor (2012).

Foram realizadas trinta e oito análises CG, 17 análises CG-EM, dos extratos das glândulas odoríficas abdominais do macho maduro (FIGURA 33), em concentrações de 1 unidade em 50 μ L de hexano, evidenciando-se que apresenta um conjunto de compostos que forma um “*bouquet*” odorífico específico.

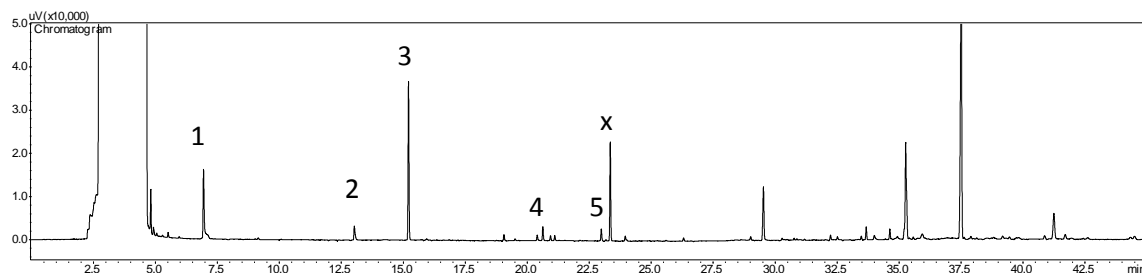


FIGURA 33. Cromatograma do extrato da glândula odorífica abdominal do macho maduro; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).

FONTE: O autor (2012).

A comparação entre cromatogramas do macho mostra que o macho adquire o “*bouquet*” odorífico em três dias após a emergência (FIGURA 34).

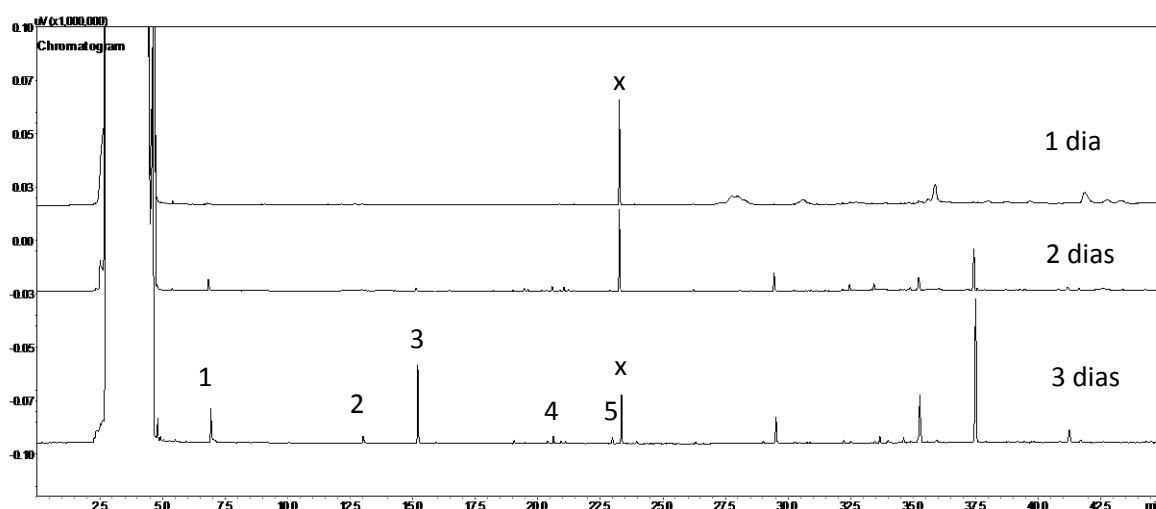


FIGURA 34. Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal do macho com 1, 2 e 3 dias; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).

FONTE: O autor (2012).

A análise estatística dos compostos possivelmente com bioatividade no macho com um, dois e três dias, mostra que as diferenças quantitativas observadas nos dados de pesquisa se mantiveram nos dados transformados.

O composto um, apresentou-se estatisticamente igual nos dois primeiros dias e diferente no terceiro dia, tanto nos dados de pesquisa (brutos) quanto nos dados transformados (GRÁFICO 3).

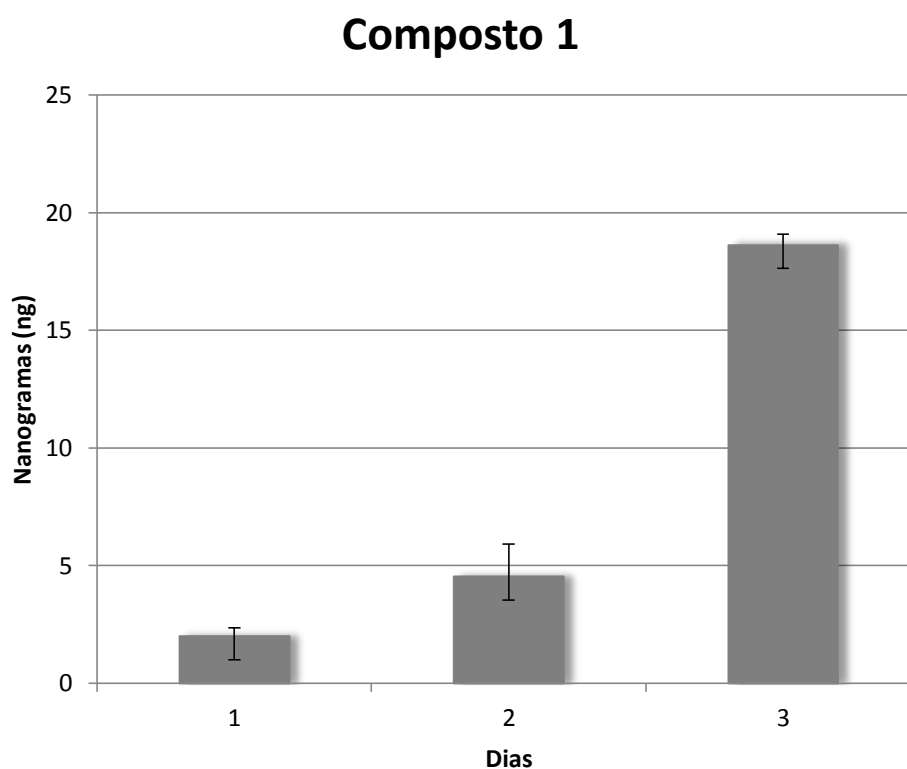


GRÁFICO 3. Variação do composto (1) um das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de *H. erato phyllis* em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 107.0$, $GL = 2$.
FONTE: O autor (2012).

O composto dois apresentou-se estatisticamente igual nos dois primeiros dias e diferente no terceiro dia, tanto nos dados de pesquisa (brutos) quanto nos dados transformados (GRÁFICO 4).

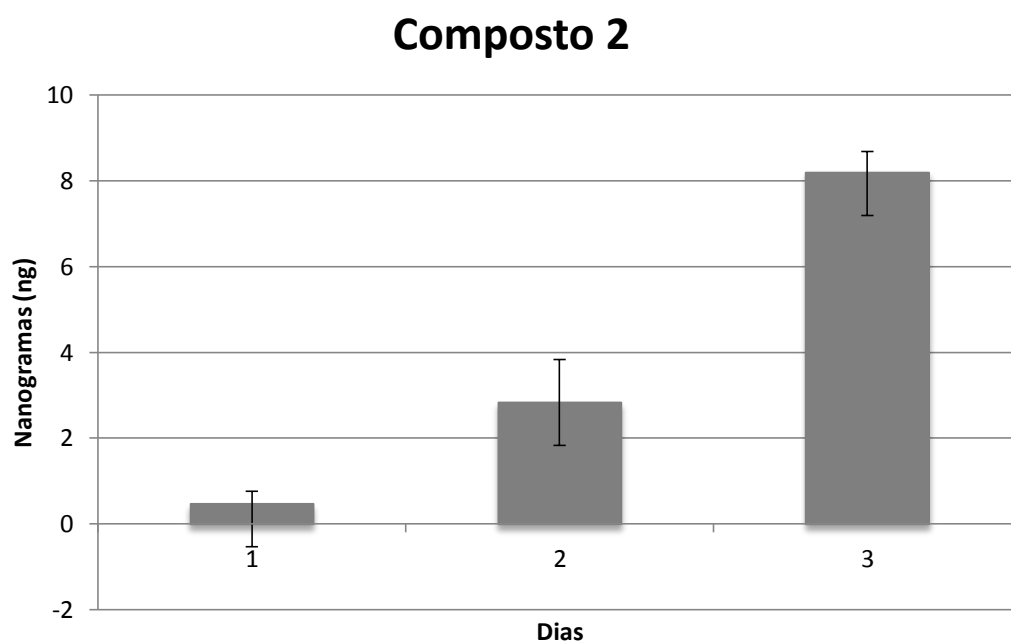


GRÁFICO 4. Variação do composto (2) dois das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de *H. erato phyllis* em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 34.8$, $GL = 2$.

FONTE: O autor (2012).

O composto três apresentou-se estatisticamente igual nos dois primeiros dias e diferente no terceiro dia, tanto nos dados de pesquisa (brutos) quanto nos dados transformados (GRÁFICO 5).

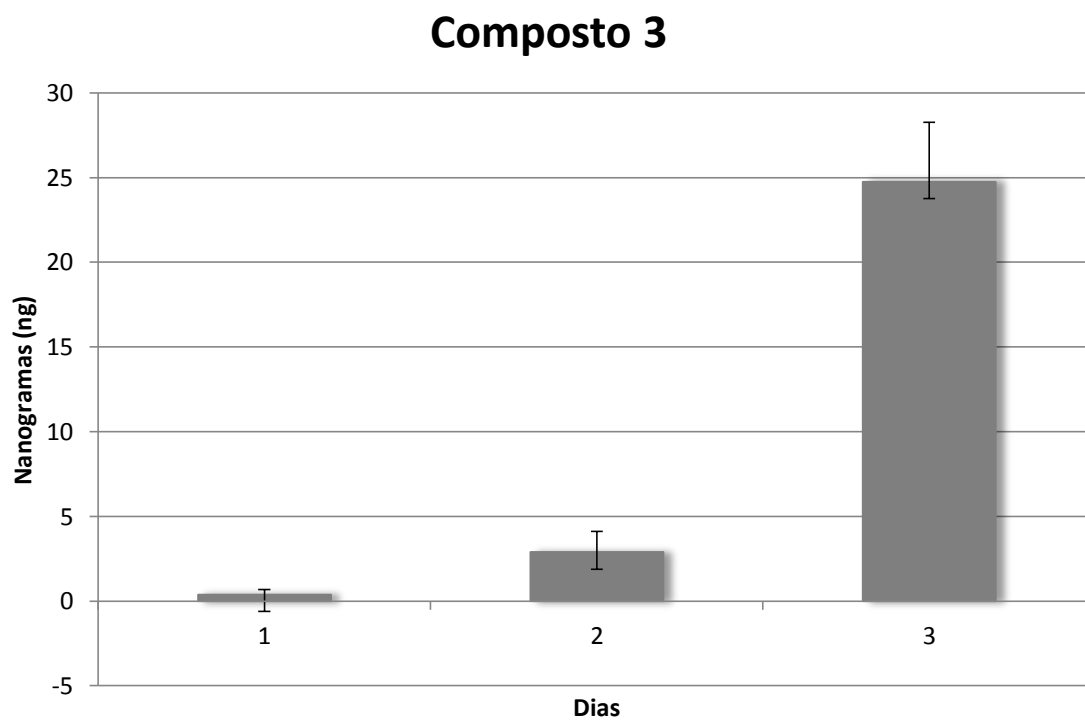


GRÁFICO 5. Variação do composto (3) três das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de *H. erato phyllis* em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 38,4$, $GL = 2$.
FONTE: O autor (2012).

O composto quatro apresentou-se estatisticamente igual nos dois primeiros dias e diferente no terceiro dia, tanto nos dados de pesquisa quanto nos dados transformados (GRÁFICO 6).

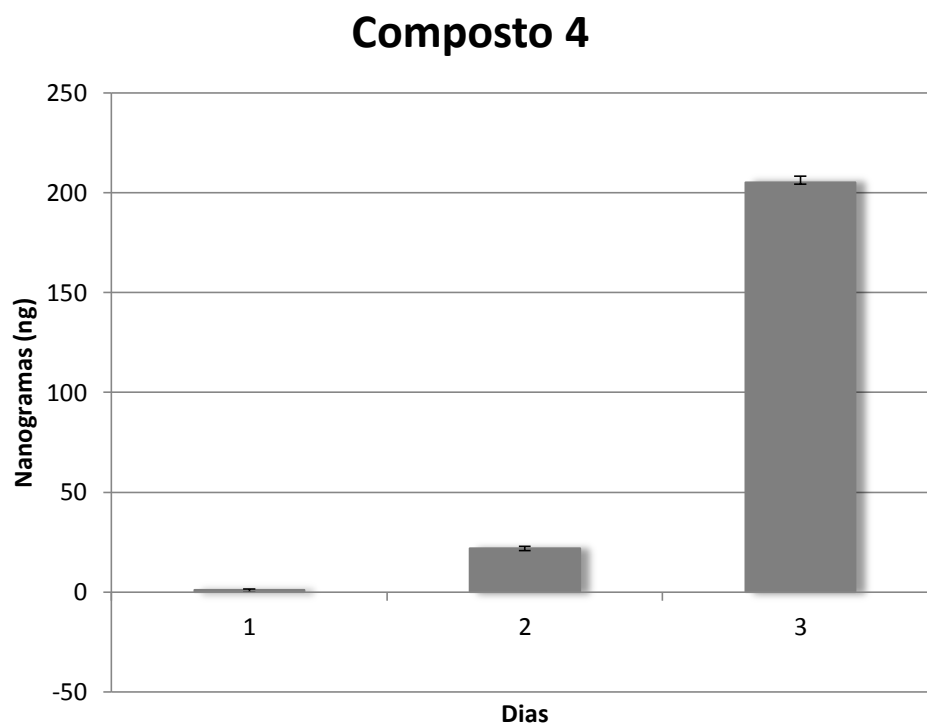


GRÁFICO 6. Variação do composto (4) quatro das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de *H. erato phyllis* em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 13,2$, $GL = 2$.

FONTE: O autor (2012).

O composto cinco apresentou-se estatisticamente diferente nos três dias, nos dados de pesquisa e nos dados transformados (GRÁFICO 7).

Composto 5

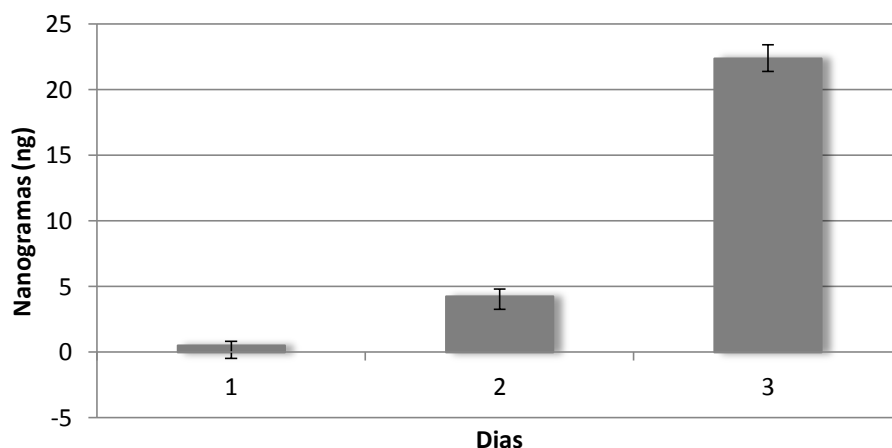


GRÁFICO 7. Variação do composto (5) cinco das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho de *H. erato phyllis* em um, dois e três dias; dados transformados. Anova, $p < 0,05$, $F = 7,9$, $GL = 2$. FONTE: O autor (2012).

A análise comparativa de cromatogramas da fêmea virgem, fêmea acasalada e macho acasalado (FIGURA 35), com concentração de uma unidade em 50 μ L de hexano, exibe a transferência de compostos possivelmente com efeito antiafrodisíaco, do macho para a fêmea após o acasalamento.

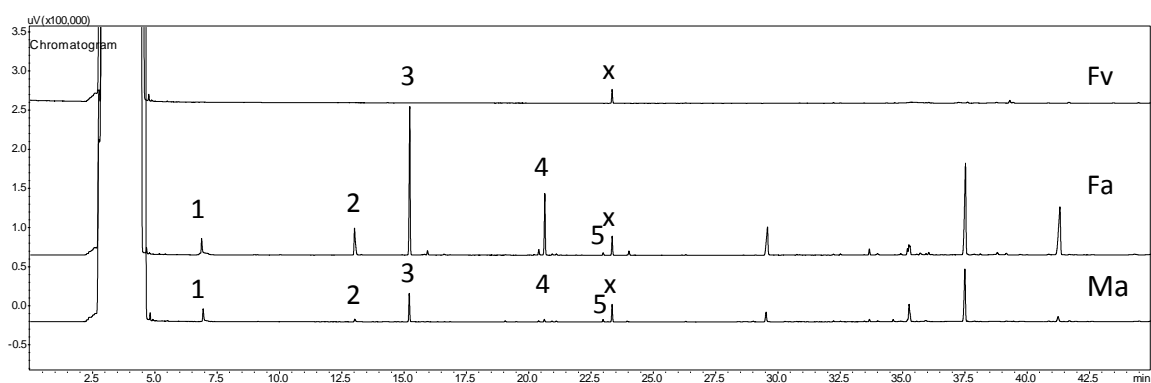


FIGURA 35. Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal da (Fv), fêmea virgem; (Fa), fêmea acasalada; e (Ma) macho acasalado, logo após o acasalamento; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).

FONTE: O autor (2012).

A análise comparativa de cromatogramas do macho e fêmea, logo após o acasalamento (FIGURA 36), mostra que na fêmea a quantidade de voláteis é sempre maior.

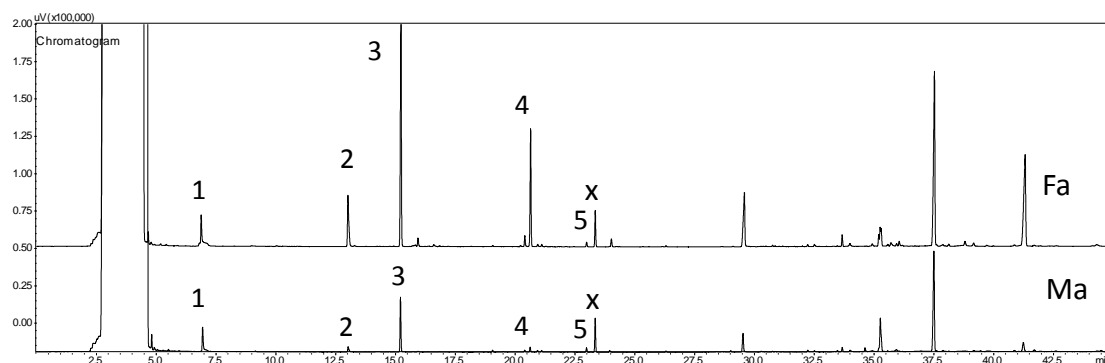


FIGURA 36. Comparação entre cromatogramas do extrato da glândula odorífica abdominal; (Ma), macho acasalado; (Fa), fêmea acasalada, logo após o acasalamento; (1, 2, 3, 4 e 5), compostos que possivelmente possuem bioatividade; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 μ L/extrato).
FONTE: O autor (2012).

A comparação das médias das amostras (n=2) mostra que logo após o acasalamento existe uma diferença quantitativa entre os compostos um (GRÁFICO 8), dois (GRÁFICO 9), três (GRÁFICO 10), quatro (GRÁFICO 11) e cinco (GRÁFICO 12), no macho e fêmea. Os gráficos mostram que após o acasalamento a fêmea apresenta uma quantidade maior de voláteis que o macho em todos os compostos.

Médias do Composto 1

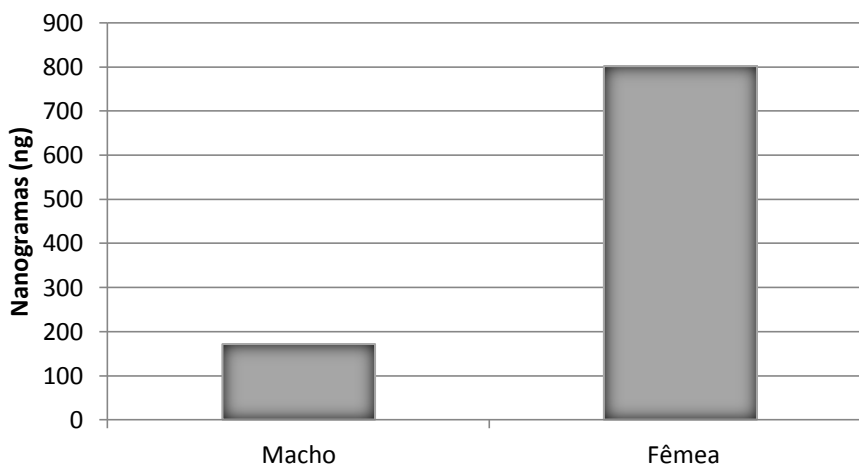


GRÁFICO 8. Quantidade média do composto um das glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea de *H. erato phyllis*, logo após o acasalamento.
FONTE: O autor (2012).

Médias do Composto 2

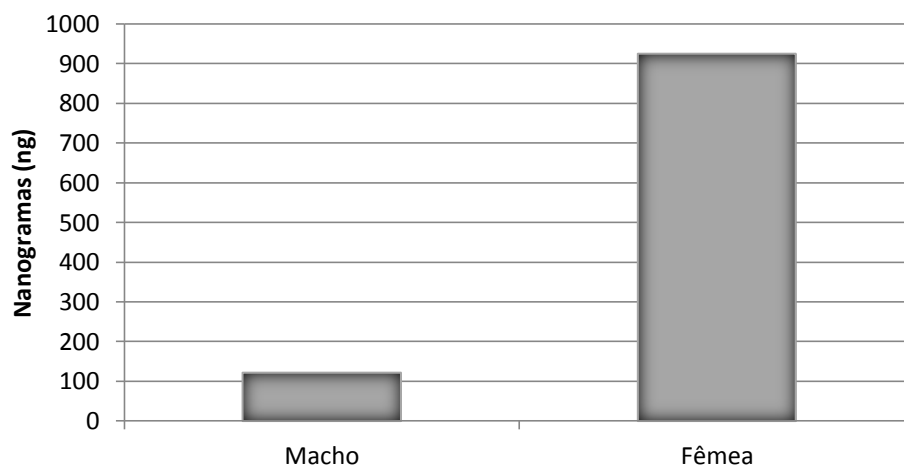


GRÁFICO 9. Quantidade média do composto dois das glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea de *H. erato phyllis*, logo após o acasalamento.
FONTE: O autor (2012).

Médias do Composto 3

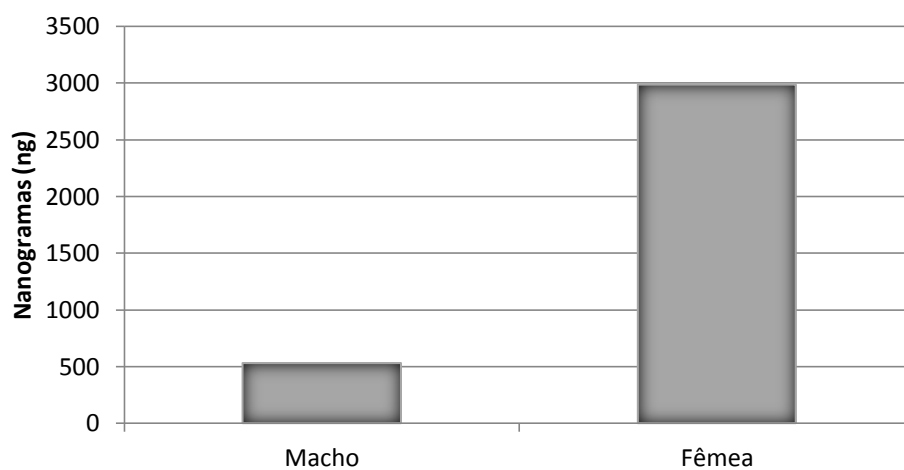


GRÁFICO 10. Quantidade média do composto três das glândulas odoríficas abdominais do macho e da fêmea de *H. erato phyllis*, logo após o acasalamento.
FONTE: O autor (2012).

Médias do Composto 4

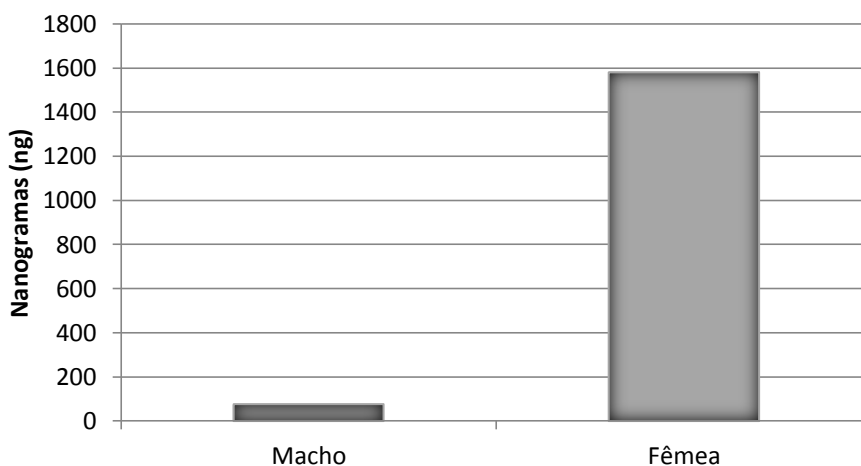


GRÁFICO 11. Quantidade média do composto quatro das glândulas odoríferas abdominais do macho e da fêmea de *H. erato phyllis*, logo após o acasalamento.
FONTE: O autor (2012).

Médias do Composto 5

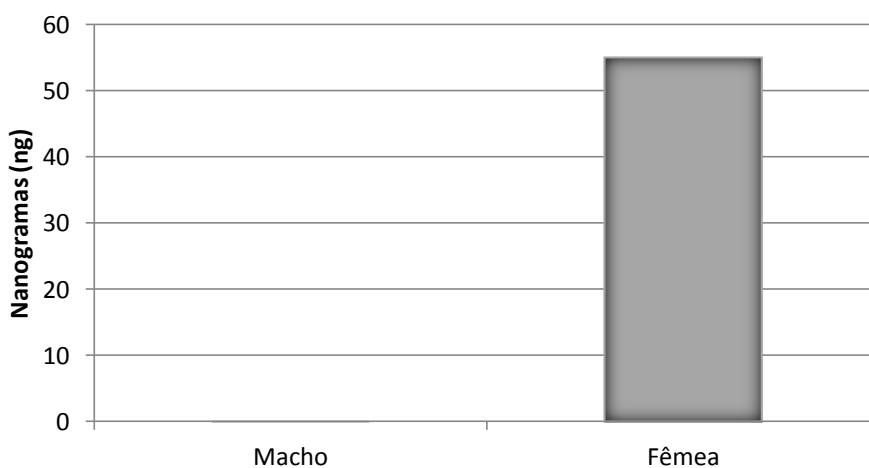


GRÁFICO 12. Quantidade média do composto cinco das glândulas odoríferas abdominais do macho e da fêmea de *H. erato phyllis*, logo após o acasalamento.
FONTE: O autor (2012).

4.3 Atividade biológica intraespecífica

4.3.1 Bioensaios

Foram realizados dez testes nos quais, cinco fêmeas virgens e cinco machos virgens, foram expostos a voláteis do extrato da glândula odorífica abdominal do sexo oposto.

Comportamentos observados

Os machos não apresentaram nenhum dos comportamentos de corte para o extrato da fêmea virgem. Conclui-se que a glândula odorífica abdominal da fêmea virgem não produz voláteis de feromônio sexual.

As fêmeas apresentaram os seguintes comportamentos de corte para o extrato do macho maduro: pousada, separa um pouco asas posteriores das anteriores (60%), vibra as asas (60%) e contrai as asas fechadas (100%) (FIGURA 37). O número de indivíduos com resposta aos voláteis do extrato foi analisado pelo teste qui-quadrado (TABELA 1).

Os comportamentos de expor a glândula odorífica abdominal, rodar sem deslocamento, mudar a posição, voos de curta duração, pousar, abrindo e separando as asas, e expor as margens dorsais das asas anteriores e posteriores não foram observados.



FIGURA 37. Imagem de fêmea virgem sendo exposta aos voláteis da glândula odorífica abdominal de macho maduro de *H. erato phyllis*; (asterisco), papel filtro com o extrato.
FONTE: O autor (2011).

TABELA 1. ATIVIDADE BIOLÓGICA INTRAESPECÍFICA DO EXTRATO DA GLÂNDULA ODORÍFICA ABDOMINAL DO MACHO OBSERVADA EM FÊMEAS VIRGENS DE *Heliconius erato phyllis*

	Com resposta	Sem resposta
Nº de indivíduos	5*	0

* Diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 5$, $p < 0.05$).

FONTE: O autor (2012).

4.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à detector eletroantenográfico (CG-EAD)

Foi testada a atividade biológica dos compostos de extratos de fêmea virgem (concentração de 1 a 10 µL/glândula) e de macho maduro (concentração de 1 a 50 µL/glândula) para machos maduros e fêmeas virgens.

Foram realizadas vinte e quatro análises em CG EAD do extrato da fêmea e antena do macho, onde não se observou resposta da antena do macho (FIGURA 38).

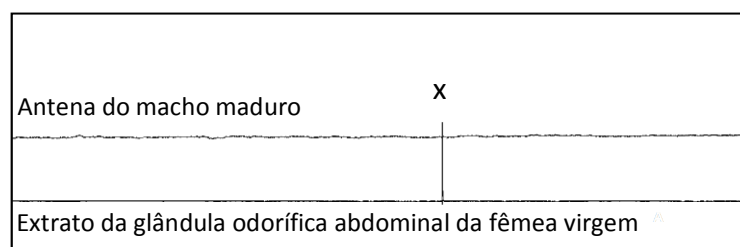


FIGURA 38. Detalhe de eletroantenograma de resposta da antena do macho maduro para o extrato da glândula odorífica abdominal da fêmea virgem; (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a 5 µL/extrato).

FONTE: O autor (2012).

Foram realizadas cinquenta e duas análises em CG EAD do extrato do macho maduro e antena da fêmea virgem, onde se observou resposta da antena da fêmea para o composto cinco (FIGURA 39), com tempo de retenção de $\pm 23,02$ min.

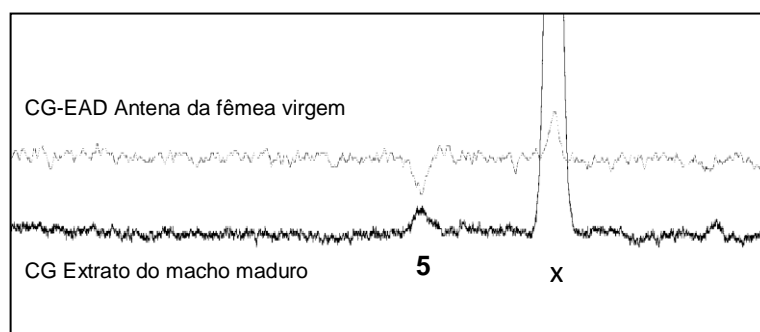


FIGURA 39. Detalhe de eletroantenograma de resposta da antena da fêmea virgem para o extrato da glândula odorífica abdominal do macho maduro; (5), composto com atividade biológica ($IR = \pm 23,02$ min); (x), padrão interno (tetradecano, 100ppm a $5\mu\text{L}/\text{extrato}$).
 FONTE: O autor (2012).

Foram realizadas vinte análises em CG EAD do extrato da fêmea acasalada e antena do macho maduro, onde se observou indícios de resposta da antena do macho maduro para os compostos dois, três, quatro e cinco, dependendo-se de mais dados para confirmar esta informação.

4.4 Caracterização - Localização e morfologia externa das Glândulas Odoríficas Abdominais

4.4.1 Localização

4.4.1.1 Fêmea – Abdome

Abdome longo e delgado, característico do grupo *Heliconius* Kluk, 1780, composto de dez segmentos, sendo que nestas fêmeas o segmento VIII apresenta a porção dorsal exposta como uma fina banda esclerotizada, e as demais estruturas e segmentos IX e X são modificados para formar a genitália. Cada segmento com tergo, esterno e pleura, lateralmente na região central da pleura estão os espiráculos de forma ovalada nos segmentos um a sete (FIGURA 40).

O tergo I é menor e apresenta modificações quando comparado aos demais, relacionadas à articulação tórax-abdome. Anteriormente a barra tergo-pleural contorna dorsalmente o espiráculo I, na porção distal outra projeção se une ao esterno I, formando a barra pós-espiracular. O esterno I é estreito e com projeção anterior delgada, que se une a extremidade anterior da barra tergo-pleural, formando a barra pré-espiracular.

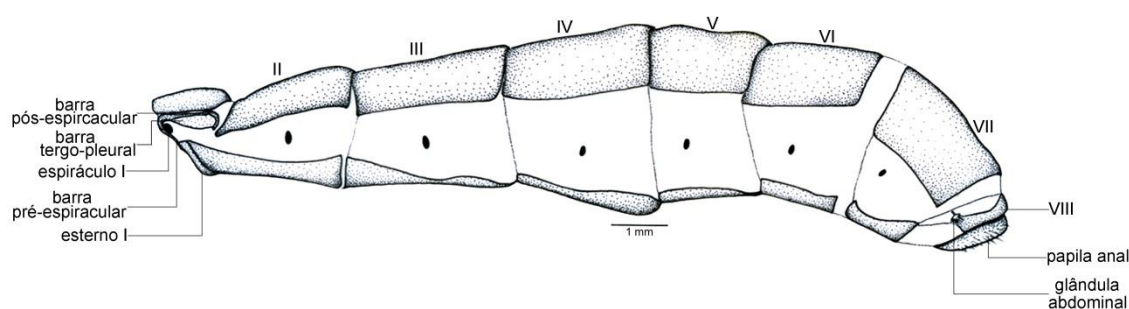


FIGURA 40. Abdome da fêmea em vista lateral; (I-VIII), segmentos.
FONTE: O autor (2012).

A glândula odorífica abdominal encontra-se dorsalmente e lateralmente sob o sétimo segmento e é composta por um tecido bastante delicado, a qual pode ser protraída ao comprimir o abdome. Esta glândula possui um processo externo no sétimo segmento, como um pedúnculo com uma estrutura em forma de leque, o bastão odorífico, em sua porção distal e revestido de cerdas, que provavelmente tem a função de dissipar os voláteis produzidos e/ou recebidos.

4.4.1.2 Macho – Genitália

Assim como nos demais lepidópteros, a genitália masculina é formada pela modificação do IX e X segmentos abdominais. O nono tergo origina o tegume, semitriangular e fortemente esclerotizado, o nono esterno a projeção do saco, em *H. erato phyllis* o saco, apresenta uma longa projeção anterior e é interligado ao tegume pelo braço do saco, que se estende até a base do tegume, além de possuir uma projeção lateral sobressalente. O décimo tergo origina o unco, alongado e

fusionado ao tegume, embora se possa visualizar um limite entre estes escleritos, o décimo esterno origina o gnato que sustenta o tubo anal envolvendo-o ventralmente (FIGURA 41A). Ao centro localiza-se o pênis, e lateralmente as valvas, que segundo Niculescu (1973), são formadas pelas membranas intersegmentares IX-X, simples, simétricas, formato triangular e com porção dorsal dilatada e espinhos na porção distal, na porção centro mediana na região interna da valva há a glândula odorífica, como uma bolsa translúcida inflada e de um tecido muito fino e delicado, revestida por cerdas longas que provavelmente possuem a função de dissipar voláteis (FIGURA 41B).

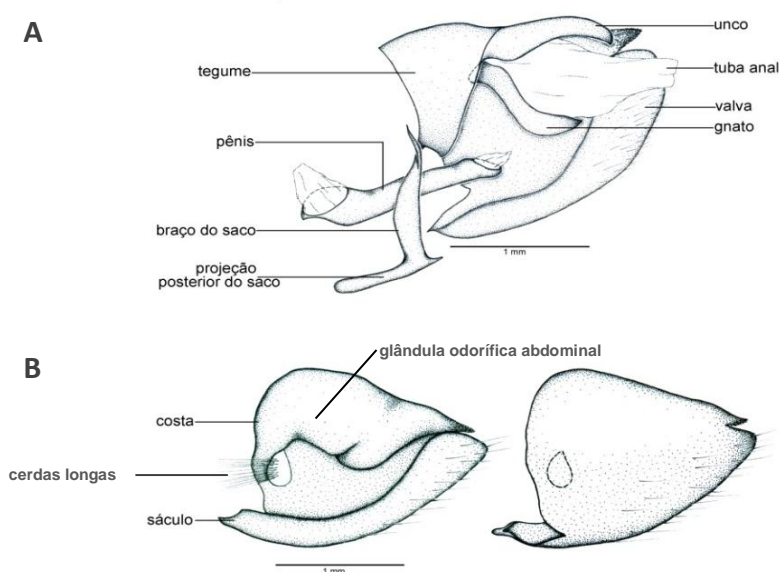


FIGURA 41. A, ilustração esquemática da genitália do macho. B, valva, face interna e externa.
FONTE: O autor (2012).

4.4.2 Morfologia externa

4.4.2.1 Fêmea

A glândula apresenta-se na forma de um saco amarelo, levemente bilobado entre os segmentos VII e VIII, os dois lobos separados na sua superfície por área

esclerotizada. A glândula é extrudada por pressão hidrostática interna, exibindo dois bastões odoríficos laterais (FIGURA 42A), que possuem conexão com as laterais da glândula onde estão os lobos do saco (FIGURA 42B), correspondentes (FIGURA 42C).

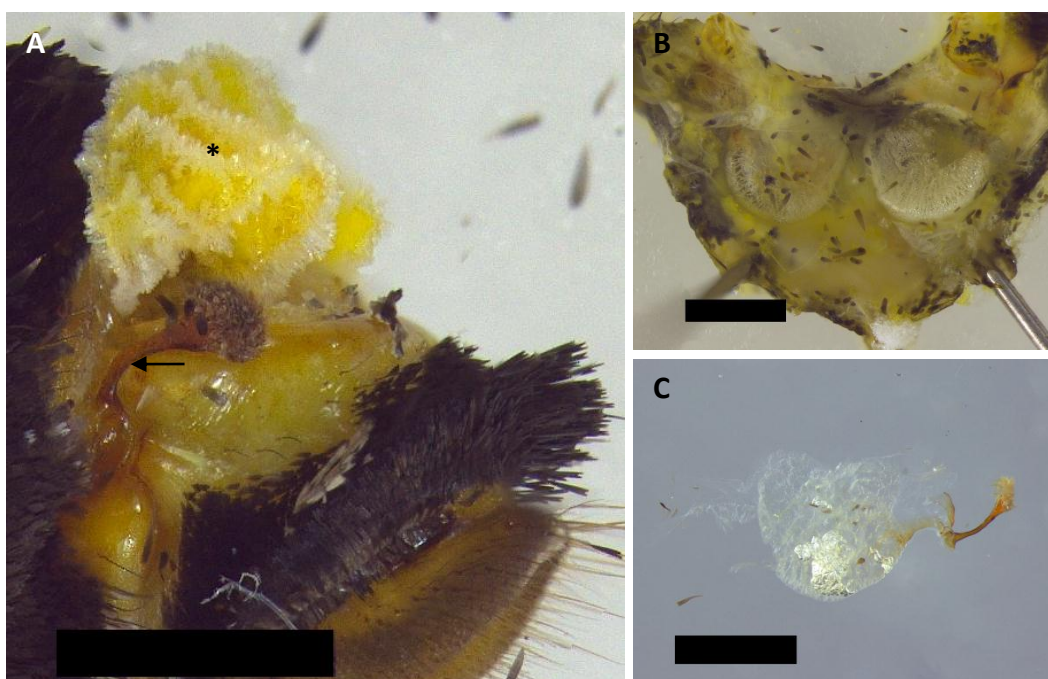


FIGURA 42. A, bastão odorífico da glândula odorífica abdominal da fêmea de *H. erato phyllis* (seta), lobo do saco glandular mostrando as projeções translúcidas (asterisco). Aum.= 25x. B, lobos recolhidos, vista interna. Aum.= 32x. C, lobo do saco glandular mostrando conexão com bastão odorífico. Aum.= 40x. Barras= 1 mm.
FONTE: O autor (2012).

A superfície dos lobos é coberta por pregas com projeções translúcidas (FIGURA 43A); os lobos são delimitados por área esclerotizada (FIGURA 43B).

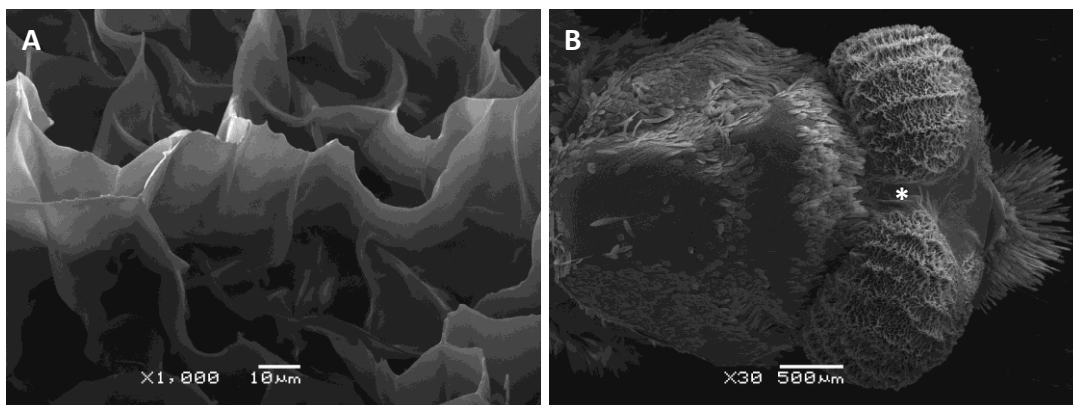


FIGURA 43. A, detalhe das projeções translúcidas. B, os dois lobos do saco glandular separados na sua superfície por área esclerotizada (asterisco).
FONTE: O autor (2012).

O bastão odorífico apresenta uma base alargada que afila em direção à extremidade; na sua porção mediana, dobra-se aproximadamente 90° e afasta-se na sua porção distal quase 30° da lateral do corpo da glândula (FIGURA 44A), expondo na sua extremidade uma estrutura em forma de leque revestida de cerdas, quando a glândula é inflada (FIGURA 44B).

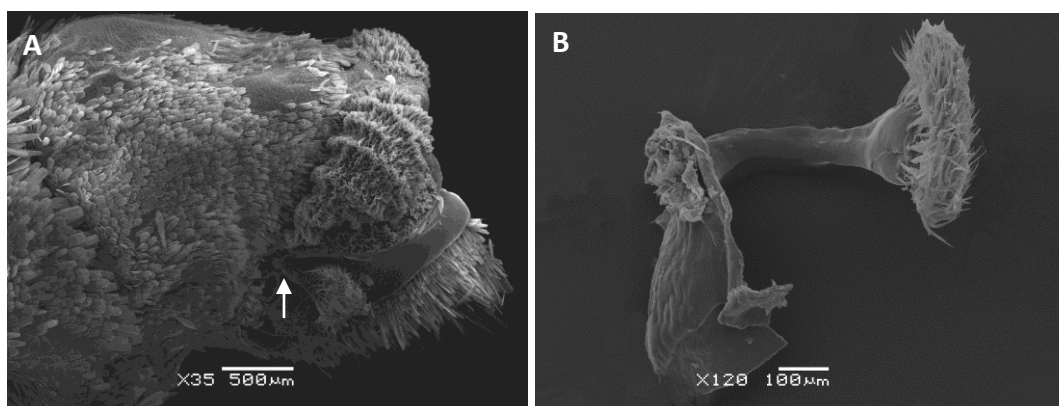


FIGURA 44. A, glândula odorífica abdominal em vista lateral, bastão odorífico (seta). B, detalhe do bastão odorífico.
FONTE: O autor (2012).

Os bastões odoríficos e projeções translúcidas tem possivelmente a função de receber e/ou dissipar voláteis.

4.4.2.2 Macho

A glândula, corresponde a um bolso cheio de secreção, em forma de harpa na face interna das valvas. O orifício para eliminação da secreção, descrito por Eltringham (1925) como um orifício alongado em *H. erato* Linnaeus 1758, em *H. erato phyllis* encontra-se preenchido por cerdas longas e translúcidas (FIGURA 45A). A transferência dos odores antiafrodisíacos às fêmeas provavelmente se dá por contato entre as cerdas das valvas do macho com o saco amarelo da glândula odorífica abdominal da fêmea. Na extremidade afilada e queratinizada da face interna da valva são encontrados denticulos, arranjados em conjunto de três unidades, com aproximadamente vinte conjuntos encaixados inicialmente (FIGURA 45B).

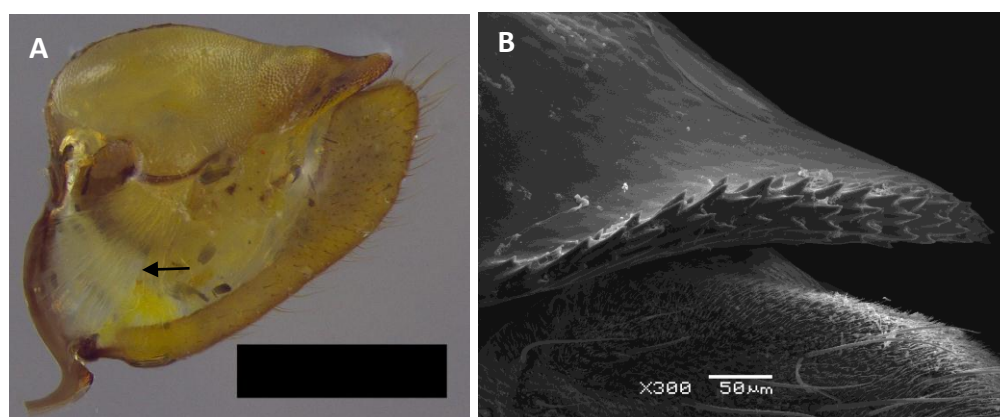


FIGURA 45. A, valva do macho de *H. erato phyllis* mostrando as cerdas translúcidas (seta), Aum.= 40x, Barra= 1 mm. B, detalhe da extremidade afilada e queratinizada da face interna da valva com denticulos.

FONTE: O autor (2012).

5 DISCUSSÃO

Os resultados das análises químicas mostram que o macho transfere todo o “bouquet” odorífico das suas glândulas odoríferas abdominais das valvas para a glândula odorífica abdominal da fêmea, que assim adquire o mesmo odor das glândulas das valvas dos machos sendo possivelmente percebida como macho pelos coespecíficos, quando expõe o saco glandular e os bastões odoríferos, na aproximação coespecíficos e situações de manipulação; podendo ser usada em situações de defesa. As glândulas odoríferas abdominais das valvas dos machos, de acordo com o método utilizado de cromatografia gasosa, apresentam uma composição química com algumas semelhanças e diferenças com a apresentada por *H. melpomene* (dentre as espécies do gênero com resultados cromatográficos publicados). Foram detectados cinco compostos que possivelmente tenham atividade biológica intraespecífica e interespecífica. Com menores tempos de retenção, dois compostos, um e dois (1 e 2) são observados inicialmente, acredita-se que possivelmente estejam envolvidos em comunicação de alerta e defesa interespecífica. O composto três (3), o mesmo composto descrito como β -ocimeno, antiafrodisíaco para *H. melpomene*. O composto quatro (4), possivelmente muito semelhante aos compostos um e dois (1 e 2), e provavelmente envolvido também com o alarme e defesa. O composto cinco (5) foi o composto com resposta eletroantenográfica significativa da fêmea virgem para o extrato do macho maduro, corroborada pelos resultados obtidos nos bioensaios com fêmeas virgens. Significando que provavelmente o composto cinco esteja relacionado com o reconhecimento intraespecífico do macho, sendo um composto macho específico. Considerando-se que a evolução dos antiafrodisíacos em Heliconinae seja resultado da seleção intrasexual (ESTRADA *et al.* 2011), a partir da competição entre machos, conclui-se que um composto macho específico presente no antiafrodisíaco, também tenha evoluído através desta seleção. Levando-se em conta que até o momento não foram encontradas evidências de compostos macho específicos nos buquês odoríferos das glândulas odoríferas abdominais de machos de outros heliconíneos; supõem-se a sua existência em outras espécies e subespécies. A subespécie *H. erato phyllis* é considerada monoândrica (KLEIN &

ARAÚJO 2010), e possivelmente o composto macho específico liberado pelas glândulas odoríficas das fêmeas, seja um dos elementos que contribuem para esta condição, pois possivelmente seja percebido entre coespecíficos receptores. *H. erato* assim como *H. erato phyllis* formam dormitórios comunaes de modo circadino e várias hipóteses evolutivas tentam explicar a origem do fenômeno; dentre estas se destaca a proteção contra predadores; a sua utilização como centro de informações sobre fontes alimentares, como facilitador da identificação de micro habitats adequados às necessidades específicas e, como um comportamento determinado por alguns aspectos da biologia de *H. erato* (ENDRINGER *et al.* 2004). Incluiu-se a estas hipóteses a possível existência de composto macho específico em heliconíneos, para a formação de dormitórios comunaes; assim reforçando a hipótese evolutiva de origem da agregação pela atração entre os sexos somada ao comportamento de manutenção e utilização de uma área de vida restrita que poderiam, por si só, serem responsáveis pela agregação noturna (Hipótese da inércia evolutiva), segundo Malet (1984). Robustece esta ideia o fato de que a estimulação das glândulas das asas dos machos (androcônia) faz parte do comportamento de corte e, de que os odores das glândulas odoríficas abdominais serem mais facilmente dissipados, através de breve exibição, por meio da abertura das valvas e pela protrusão da glândula odorífica abdominal dorsal amarela. Em insetário de criação seminatural foi observado que durante a cópula, vários coespecíficos pousam com as asas fechadas próximo ao casal em cópula. Este comportamento, possivelmente relacionado ao odor liberado pelas glândulas odoríficas abdominais, pode contribuir para a determinação da origem de formação dos dormitórios comunaes. As análises cromatográficas mostram que a glândula odorífica abdominal da fêmea virgem não possui voláteis de defesa e compostos fêmea específicos, resultado este corroborado pelas análises eletroantenográficas com antenas de machos maduros e bioensaios de atividade biológica, que não mostraram resposta do macho ao extrato da fêmea virgem. Nos bioensaios com fêmeas virgens o extrato das glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho promoveu atividade biológica com a observação de três comportamentos iniciais de corte, dentre os sete caracterizados, nas fêmeas testadas. Supõe-se que os demais comportamentos não foram observados devido à necessidade de visualização do macho para as etapas de comportamento seguintes da fêmea. Em teste de campo, onde foram colocados papéis filtros com extrato das glândulas odoríficas abdominais

do macho de *H. erato phyllis*, pendurados por fio de linha em árvores, onde existia uma grande variedade de borboletas, notou-se que este atraiu várias espécies de borboletas, sendo que, em especial, uma Pieridae ficou por mais tempo sobre o papel filtro, durante alguns instantes. Este comportamento observado sugeriu que existam compostos interespecíficos nos extratos das glândulas odoríficas abdominais de *H. erato phyllis*. Os resultados morfológicos mostram que as glândulas odoríficas abdominais da fêmea apresentam o mesmo padrão morfológico apresentado para análises feitas em outras espécies. Excetuando-se pelo detalhamento as projeções translúcidas da superfície de seus lobos e morfologia dos bastões odoríficos. As glândulas odoríficas abdominais das valvas do macho apresentam resultado relatado pela primeira vez, que descreve as cerdas longas e translúcidas que partem do orifício da glândula. Propõe-se que a transferência de voláteis para a glândula odorífica abdominal da fêmea se dê por contato desta com as cerdas longas da glândula odorífica abdominal das valvas dos machos e que os dentículos existentes na região apical da face interna das valvas auxiliem na fixação da valva sobre a glândula odorífica da fêmea. A contribuição das glândulas odoríficas abdominais para o sucesso adaptativo da subespécie é sugerido pela total transferência do “*bouquet*” odorífico do macho para a fêmea, que dentre todos os benefícios para a fêmea e macho acasalado relatados na literatura, acrescenta-se a possível transferência de composto macho específico que além da função sexual adicionaria as características de promover a monandria, que permite maior sobrevivência da fêmea e a formação dos dormitórios comunitários cuja função ainda não está definida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, J. 2004. Sexual conflict and anti-aphrodisiac titre in a polyandrous butterfly: male ejaculate tailoring and absence of female control. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences** **271**:1765–1770.
- ANDERSSON, J., BORG-KARLSON, A. K., VONGVANICH, N. & C. WIKLUND. 2007. Male sex pheromone release and female mate choice in a butterfly. **Journal of Experimental Biology** **210**: 964–970.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K. & C. WIKLUND. 2000. Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences** **267**:1271–1275.
- ANDERSSON, J.; BORG-KARLSON, A. K. & C. WIKLUND. 2003. Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: a theme with variation! **Journal of Chemical Ecology** **29**:1489–1499.
- ARAK, A. & M. ENQUIST. 1995. Conflict, receiver bias and the evolution of signal form. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences** **349**:337–344.
- AYASSE, M.; PAXTON R. J. & J. TENGÖ. 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual Review of Entomology** **46**:31–78.
- BATEMAN, P. W.; FERGUSON, J. W. H. & C. A. YETMAN. 2006. Courtship and copulation, but not ejaculates, reduce the longevity of female field crickets (*Gryllus bimaculatus*). **Journal of Zoology** **268**:341–346.
- BILOTTA, I. G. 1994. Morfologia comparada do abdome das espécies sub Brasileiras de Morphinae (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE). **Revista Brasileira de Zoologia** **11** (4): 737–748.
- BONFANTTI, D. 2010. **Genitália masculina de Charaxinae neotropical (Lepidoptera: Nymphalidae): uma análise comparada da variação dos**

caracteres. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de concentração em Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOPPRÉ, M. 1984. Chemically mediated interactions between butterflies , p. 259–275. *In*: Vane-Wright, R. I. & P. R. Ackery (Eds.). **The Biology of Butterflies**. Academic Press, London.

CARDOSO, M. Z., ROPER, J. J. & L. E. GILBERT. 2009. Prenuptial agreements: mating frequency predicts gift-giving in *Heliconius* species. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **131**: 109–114.

CLUTTON-BLOCK, T. & P. LANGLEY. 1997. Persistent courtship reduces male and female longevity in captive tsetse flies *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). **Behavioral Ecology** **8**:392–395.

COOK, S. E.; VERNON, J. G.; BATESON, M., & T. GUILFORD. 1994. Mate choice in the polymorphic African swallowtail butterfly, *Papilio dardanus*: male-like female may avoid sexual harassment. **Animal Behaviour** **47**:389–397.

COSTANZO, K. & A. MONTEIRO. 2007. The use of chemical and visual cues in female choice in the butterfly *Bicyclus anynana*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **274**: 845–851.

DE VRIES, P.J. 1987. **The Butterflies of Costa Rica and their Natural History: Volume 1, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae**. Princeton University Press. 327 p.

DEINERT, E.I. 2003. Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly, p. 91–108. *In*: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (Eds.) **Butterflies: ecology and evolution taking flight**. University of Chicago Press, Chicago.

EHRLICH, P. R. 1958. The comparative morphology, phylogeny and classification of the butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea). **University of Kansas Science Bulletin** **39** (8): 305–370.

ELTRINGHAM, M. A. 1925. On the abdominal glands in *Heliconius* (Lepidoptera). **Transactions of the Royal Entomological Society of London** Parts. I, II, p. 269–275.

- ELTRINGHAM, M. A. 1926. On the abdominal glands in *Colaenis*, *Dione* and *Eueides* (Lepidoptera). **Transactions of the Royal Entomological Society of London** Part. II **74**: 263–267.
- EMSLEY, M. G. A. 1963. Morphological study of image Heliconiinae (Lep.: Nymphalidae) with a consideration of the evolutionary relationships within the group. **Zoologica** **48**:85–131.
- ENDRINGER, F. B.; SILVA, P. R. & LUTZ, L. V. 2004. Hipóteses evolutivas sobre a origem e manutenção dos dormitórios comuns de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Natureza on line** **2**(1): 1–9.
- ESTRADA, C. & C. D. JIGGINS 2008. Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? **Journal of Evolutionary Biology** **21**: 749–760.
- ESTRADA, C. 2009. **Sexual behavior, intraspecific signaling and the evolution of mimicry among closely related species**. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin.
- ESTRADA, C.; SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S. & L. E. GILBERT. 2011. Sexual selection drives the evolution of antiaphrodisiac pheromones. **Evolution** **65**-10: 2843–2854.
- ESTRADA, C.; YILDIZHAN, S., SCHULZ, S. & L. E. GILBERT. 2009. Sex-specific chemical cues from immatures facilitate the evolution of mate guarding in *Heliconius* butterflies. **Proceedings of the Royal Society** **277**: 407–413.
- GILBERT, L. E. 1976. Postmating female odor in *Heliconius* butterflies: a male contributed antiaphrodisiac? **Science** **193**: 419–420,
- GILBERT, L. E. 2003. Adaptive novelty through introgression in *Heliconius* wing patterns: evidence for a shared genetic ‘toolbox’ from synthetic hybrid zones and a theory of diversification, p. 281–318. *In*: C. L. Boggs, W. Watt, and P. R. Ehrlich, (Eds.). **Ecology and evolution taking flight: butterflies as model study systems**. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- HAPP, G. 1969. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. **Nature** **222**:180–181.

- HUIGENS, M. E., WOELKE, J. B., PASHALIDOU, F. G., BUKOVINSZKY, T., SMID, H. M. & N. E. FATOUROSA. 2010. Chemical espionage on species-specific butterfly anti-aphrodisiacs by hitchhiking *Trichogramma* wasps. **Behavioral Ecology** **21**:470–478.
- JETZ, W.; ROWE, C. & T. GUILFORD. 2001. Non-warning odors trigger innate color aversions—as long as they are novel. **Behavioral Ecology** **12**:134–139.
- KLEIN, A. L. & A. M. ARAUJO. 2010. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE) towards virgin and mated females: conflict between attraction and repulsion signals? **Journal of Ethology** **28**: 409–420.
- KRISTENSEN, N.; SCOBLE, M. J. & O. KARSHOLT. 2007. Lepidoptera Phylogeny and Systematics: the State of Inventorying Moths and Butterflies Diversity. **Zootaxa** **1668**: 699–747.
- KRONFORST, M. R. 2008. Gene flow persists millions of years after speciation in *Heliconius* butterflies. **BioMed Central Evolutionary Biology** **8**:98.
- KUKUK, P. 1985. Evidence for an antiaphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Dialictus). **Science** **227**:656–657.
- KYRIACOU, C. P. 2007. Behavioural genetics: sex, flies and acetate. **Nature** **446**:502–504.
- MALLET, J. L. B. 1984. **Population structure and evolution in Heliconius butterflies**. Ph. D. Thesis, University of Texas at Austin, Austin.
- MALLET, J. L. B.; BELTRÁN, M.; NEUKIRCHEN, W. & M. LINARES. 2007. Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. **BioMed Central Evolutionary Biology** **7**:28.
- MIYAKADO, M.; MEINWALD, J. & L. E. GILBERT. 1989. (R)-(Z, E)-9, 11-Octadecadien-13-olide: An intriguing lactone from *Heliconius pachinus* (Lepidoptera). **Experientia** **45**, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland.

- MOORE, B. P. & W. V. BROWN. 1989. Graded levels of chemical defense in mimics of lycid beetles of the genus *Metmorrhynchus* (Coleoptera). **Australian Journal of Entomology** 28:229–233.
- MOORE, B. P.; BROWN, W. V. & M. ROTHSCHILD. 1990. Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics. **Chemoecology** 1:43–51.
- MÜLLER, F. 1912. IX. The “Maracujá (or Passion-flowers) butterflies”, p. 651–667. *In*: LONGMANS, GREEN, and Co (Eds.). **Butterfly-hunting in many lands**. G. B. LONGSTAFF, London, 729p.
- NICULESCU, E. V. 1973. L’armure génitale chez les Lépidoptères. **Bulletin de La Société Entomologique de Mulhouse** (Suppl.): 1–96.
- OCKENFELS P., BOPPRÉ M., FISCHER O.W. & S. SCHULTZ. 1998. Chemical Communication in the Silver-Washed Fritillary, *Argynnis paphia* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: HELICONIINAE). **Poster from 15 th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology**. URL: <http://www.chemecol.org/meetings/98/posters.html>
- PALUCH, M.; CASAGRANDE, M. M. & O. H. H. MIELKE. 2008. Morfologia externa do adulto de *Actinote melanisans* (Nymphalidae: Heliconiinae: Acraeini). **Revista Brasileira de Zoologia** 25(3): 456–478.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- ROSS, G. N.; FALES, H. M.; LLOYD, H. A.; JONES, T.; SOKOLOSKI E. A.; MARSHALL- BATTY, K. & M. S. BLUM. 2001. Novel chemistry of abdominal defensive glands of Nymphalid butterfly *Agraulis vanillae*. **Journal of Chemical Ecology** 27:1219–1228.
- ROSS, P. & D. CREWS. 1977. Influence of the seminal plug on mating behavior in the garter snake. **Nature** 267:344–345.
- ROWE, C. & T. GUILFORD. 1999. The evolution of multimodal warning displays. **Evolutionary Ecology** 13:655–671.

- SCHULZ, S., BOPPRÉ, M. & R. I. VANE-WRIGHT. 1993. Specific mixtures of secretions from male scent organs of African milkweed butterflies (Danainae). **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **342**: 161–181.
- SCHULZ, S.; ESTRADA, C.; YILDIZHAN S.; M. BOPPRÉ & L. E. GILBERT. 2008. An antiaphrodisiac in *Heliconius melpomene* butterflies. **Journal of Chemical Ecology** **34**:82–93.
- SCHULZ, S.; YILDIZHAN, S.; STRITZKE, K.; ESTRADA, C. & L. E. GILBERT. 2007. Macrolides from the scent glands of the tropical butterflies *Heliconius cydno* and *Heliconius pachinus*. **Organic and Biomolecular Chemistry** **5**(21): 3434–3441.
- SCOBLE, M. J. 1995. **The Lepidoptera. Form, function and diversity.** The natural history museum in association with Oxford University Press. 404 pp.
- SCOTT, D. 1986. Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated *Drosophila melanogaster* females. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **83**:8429– 8433.
- SEIDELMANN, K. 2006. The courtship-inhibiting pheromone is ignored by female-deprived gregarious desert locust males. **Biology Letters** **2**: 525–527.
- SIDDALL, E. C. & N. M. MARPLES. 2008. Better to be bimodal: the interaction of color and odor on learning and memory. **Behavioral Ecology** **19**: 425–432.
- SIMONSEN, T. J. 2006. Glands, muscles and genitalia. Morphological and phylogenetic implications of histological characters in the male genitalia of Fritillary butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Argynnini). **Zoologica Scripta** **35**: 231–241.
- TAKANASHI, T., HIROKI, M. & Y. OBARA. 2001. Evidence for male and female sex pheromones in the sulfur butterfly, *Eurema hecabe*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **101**: 89–92.
- THORNHILL, R. & J. ALCOCK. 1983. **The evolution of insect mating systems.** Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

- TRIGO, J. R. 2000. The Chemistry of Antipredator Defense by Secondary Compounds in Neotropical Lepidoptera: Facts, Perspectives and Caveats. **Journal of Brazilian Chemical Society** **11**(6): 551–561.
- TURNER, J. R. G. 1981. Adaptation and evolution in *Heliconius*: a defense of Neo Darwinism. **Annual Review of Ecology and Systematics** **12**:99–121.
- ZHANG, Q. H. & J. R. ALDRICH. 2003. Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. **Naturwissenschaften** **90**:505–508.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As glândulas prosternais da larva de *H. erato phyllis*, objetos de estudo do capítulo I, abrem como perspectivas de trabalho futuro, uma investigação sobre a função da glândula impar e sobre a existência das glândulas prosternais em outras espécies da família Nymphalidae. A glândula impar não teve sua função desvendada no estudo. A partir disto bioensaios podem ser aplicados e a morfologia das cerdas no entorno da fenda da glândula também deve ser investigada. A análise química das secreções, realizada por profissionais da área química, confirmará ou não resultados obtidos em outras espécies. A existência das glândulas em outras espécies é incipiente; e sua averiguação trará, possivelmente, novos dados que contribuirão para a análise filogenia de Lepidoptera.

As glândulas odoríficas abdominais dos adultos de *H. erato phyllis*, objetos de estudo do capítulo II, apresentam como etapa futura de estudo a análise química dos seus compostos, realizada por profissionais da área química. Testes de eletroantenografia que clarifiquem a relação intraespecífica entre o macho e a fêmea acasalada, pois os resultados obtidos mostraram apenas alguns indícios dos compostos bioativos, e que esclareçam a bioatividade interespecífica observada em campo. A análise morfológica, em MO e MET, contribuirá para elucidação da função dos bastões odoríficos e produção de secreção pelas valvas do macho.

Proposta de estudo sobre a existência das glândulas prosternais, função da glândula prosternal impar da larva e relações interespecíficas envolvendo feromônios emitidos pelas glândulas odoríficas abdominais do adulto, em Nymphalidae

A análise morfológica das glândulas prosternais em diferentes espécies de Nymphalidae é crucial para a correção das múltiplas denominações e para, talvez, contribuir para a reestruturação da filogenia do grupo. O isolamento da secreção da

glândula impar e sua análise química são fundamentais para qualquer proposta de bioensaio. Para a o estudo das relações interespecíficas relacionadas com os voláteis emitidos pelas glândulas odoríficas das fêmeas acasaladas e machos maduros propõe-se inicialmente a análise química dos seus compostos, e testes de bioatividade a partir de análises eletroantenográficas entre heteroespecíficos, que compartilhem uma mesma área física.

APÊNDICE A – Tabelas complementares

TABELA 2. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS NA FÊMEA DE *Heliconius erato phyllis* PARA O EXTRATO DA GLÂNDULA ODORÍFICA ABDOMINAL DO MACHO

nº	Fêmeas							
	Com resposta (Comportamentos de Corte)							Sem resposta
	01 separa um pouco asas	02 Vibra as asas	03 Expõe a glândula	04 Contração das asas	05 Rotação	06 Voos curtos	07 abre e separa as asas	Nenhum dos comportamentos de corte
1	+	+		+				
2	+			+				
3		+		+				
4		+		+				
5	+			+				

(+) comportamento positivo para o papel filtro com o extrato da glândula odorífica abdominal do macho.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 3. QUANTIDADE MÉDIA DOS COMPOSTOS POSSIVELMENTE BIOATIVOS DOS EXTRATOS DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO MACHO DE *Heliconius erato phyllis* EM UM, DOIS E TRÊS DIAS.

Composto	Número de dias		
	1	2	3
1	± 4.4 ng	± 26.3 ng	± 347.6 ng
2	± 0.5 ng	± 11.0 ng	± 67.7 ng
3	± 0.4 ng	± 13.0 ng	± 650.0 ng
4	± 1.0 ng	± 21.9 ng	± 205.3 ng
5	± 0.5 ng	± 4.3 ng	± 22.4 ng

(ng), nanogramas; amostras n=4; dados de pesquisa.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 4. QUANTIDADE MÉDIA DOS COMPOSTOS POSSIVELMENTE BIOATIVOS DOS EXTRATOS DAS GLÂNDULAS ODORÍFICAS ABDOMINAIS DO MACHO e da FÊMEA DE *Heliconius erato phyllis* LOGO APÓS O ACASALAMENTO.

Composto	Adultos	
	Macho	Fêmea
1	± 170,95 ng	± 801,0 ng
2	± 121,45 ng	± 925,9 ng
3	± 532,1 ng	± 2982,6 ng
4	± 77,95 ng	± 1580,95 ng
5	± 0,05 ng	± 55,0 ng

(ng), nanogramas; amostras n=2; dados de pesquisa.

FONTE: O autor (2012).